

Aus dem Institut für Physiologie und Pathophysiologie  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Dr. Daut

AG Molekulare Physiologie  
des Fachbereiches Medizin der Philipps-Universität Marburg

# **Regulation von TRPM3 durch $\alpha_2$ -Adrenorezeptoren in pankreatischen $\beta$ -Zellen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Florian Mohr**  
(geb. in Saarbrücken)

Marburg, 2014

**Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg**

**am: 07.03.2014**

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. Johannes Oberwinkler

1. Korreferent: Prof. Dr. Patrick Michl

## Zusammenfassung

TRPM3 ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -permeabler, nichtselektiver Kationenkanal der TRP-Familie, der durch das endogene Neurosteroid Pregnenolonsulfat aktiviert werden kann. Eine funktionelle Expression des Kanals konnte unter anderem in pankreatischen  $\beta$ -Zellen nachgewiesen werden. Eine Aktivierung von TRPM3 in  $\beta$ -Zellen führt zu einem Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  und zu einer Verstärkung der Glucose-induzierten Insulinfreisetzung. Die genaue Funktion des Kanals im Kontext der  $\beta$ -Zellen ist jedoch noch nicht vollständig verstanden. Die Insulinfreisetzung in  $\beta$ -Zellen unterliegt einer äußerst strikten und vielseitigen Regulation und wird präzise den physiologischen Begebenheiten angepasst. Viele dieser Modulationen werden hierbei über G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) vermittelt. Da für viele TRP-Kanäle bekannt ist, dass sie durch GPCR moduliert werden und die überwiegende Mehrheit der an der Insulinfreisetzung beteiligten Ionenkanäle durch GPCR auf die eine oder andere Art moduliert werden, stellte sich die Frage, ob auch TRPM3 in  $\beta$ -Zellen einer solchen Regulation unterliegt.

Es zeigte sich, dass die Aktivität von TRPM3 in  $\beta$ -Zellen und Ins1 Zellen (Insulinoma Zelllinie der Ratte) durch Noradrenalin stark und reversibel inhibiert wird. Durch pharmakologische Experimente konnte nachgewiesen werden, dass die Hemmung dabei über  $\alpha_2$ -Adrenorezeptoren vermittelt wird. Eine genauere Betrachtung des zugrundeliegenden Signalwegs offenbarte, dass die TRPM3-Hemmung durch einen  $\text{G}\alpha_{i/o}$ -gekoppelten Mechanismus induziert wird. Eine Beteiligung des „klassischen“, cAMP-abhängigen Signalwegs konnte ausgeschlossen werden. In Überexpressions-experimenten zeigte sich weiterhin, dass aktivierte  $\text{G}\alpha_{i/o}$ -Untereinheiten nicht an der direkten Vermittlung der Inhibition beteiligt sind. Eine Überexpression von  $\beta\gamma$ -Untereinheiten hingegen führte zu einer drastischen Verminderung der TRPM3-Aktivität. Jedoch konnten nicht alle  $\beta\gamma$ -Kombinationen die TRPM3-Hemmung induzieren. Lediglich  $\beta_1$  und  $\beta_2$ , in Kombination mit einer  $\gamma$ -Untereinheit, waren in der Lage, die TRPM3-Aktivität zu inhibieren. Ebenso konnte in Ins1 Zellen, die mit mSIRK (einem membrangängigen Peptid, das eine Freisetzung von  $\beta\gamma$ -Untereinheiten induziert) behandelt wurden, eine Reduktion der TRPM3-Aktivität beobachtet werden.

Weiterhin konnte durch Abfangen von  $\beta\gamma$ -Untereinheiten (mittels myr-Phosducin oder myr- $\beta$ ARKct (Polypeptide, die  $\beta\gamma$ -Untereinheiten direkt binden)) die Noradrenalin vermittelte TRPM3-Hemmung deutlich abgeschwächt werden. Eine Beteiligung der PLC, der PKC, der PLA<sub>2</sub> und löslichen, cytosolischen Faktoren am Signalweg, der zur TRPM3-Hemmung führt, konnte hingegen weitgehend ausgeschlossen werden. Somit besteht die Möglichkeit, dass die Noradrenalin-induzierte Hemmung der TRPM3-Kanäle auf eine direkte Interaktion der  $\beta\gamma$ -Untereinheiten mit TRPM3 zurückzuführen ist. Es zeigte sich, dass nicht alle TRPM3-Spleißvarianten sensitiv für die durch  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor vermittelte Inhibition sind bzw. nicht alle eine verminderte Aktivität nach Überexpression von  $\beta\gamma$ -Untereinheiten aufweisen. Dafür verantwortlich scheint eine 10 Aminosäure lange Sequenz zu sein, die durch Exon 17 kodiert wird und in den insensitiven Spleißvarianten (TRPM3 $\alpha$ 4 und TRPM3 $\alpha$ 5) nicht vorhanden ist.

Die vorliegende Arbeit zeigt deutlich, dass TRPM3 in  $\beta$ -Zellen einer starken Regulierung durch  $\alpha_2$ -Adrenorezeptoren unterliegt. Dies deutet darauf hin, dass TRPM3 möglicherweise eine essentielle Funktion in  $\beta$ -Zellen besitzt, die einer ausgeprägten sympathischen Regulation bedarf. Die gewonnenen Erkenntnisse tragen somit zu einem besseren Verständnis der TRPM3-Kanäle im Kontext der  $\beta$ -Zellen bei. Die Entdeckung, dass TRPM3 durch  $G\alpha_{i/o}$ -gekoppelte GPCR moduliert werden kann, stellt ebenso eine wichtige Grundlage für nachfolgende Untersuchungen bezüglich der Rolle, Funktion und Regulation von TRPM3 in anderen Geweben dar.

## Summary

TRPM3 is a  $\text{Ca}^{2+}$  permeable nonselective cation channel of the transient receptor potential melastatin channel family. The channel is expressed in pancreatic  $\beta$  cells and can be activated by the endogenous neurosteroid pregnenolone sulphate. The activation of TRPM3 in pancreatic  $\beta$  cells leads to calcium influx followed by an enhanced glucose-stimulated insulin release. However, the physiological functions of TRPM3 in pancreatic  $\beta$  cells are not well understood so far. Insulin release in  $\beta$  cells is subject to strong and diverse regulation and can be adapted to different physiological conditions. Many of these regulations are mediated by G-protein coupled receptors (GPCR). It is well known that various TRP channels and most of the ion channels in  $\beta$  cells are regulated by GPCR. The question arose whether TRPM3 activity in  $\beta$  cells is also subject to such a regulation or modulation.

Indeed, in primary pancreatic  $\beta$  cells and rat insulinoma cells (Ins1) noradrenaline strongly and reversibly inhibits the TRPM3 activity and pharmacological experiments revealed that the inhibition is mediated via  $\alpha_2$ -adrenoreceptors. Intrigued by this effect we decided to take a closer look at the intracellular signaling cascades that mediates the TRPM3 inhibition in pancreatic  $\beta$  cells. Experiments with pertussis toxin (PTX), an inhibitor of  $G_{i/o}$ -proteins, revealed that the mechanism is  $G_{i/o}$ -protein coupled. However, we could rule out a classical regulation by alteration of intracellular cAMP levels. Also a direct interaction of  $G\alpha_{i/o}$  subunits with the channel could be excluded through overexpression experiments. By contrast, overexpression of  $\beta\gamma$ -subunits leads to a strong inhibition of the TRPM3 activity. But only  $\beta_1$  or  $\beta_2$  co-expressed with a  $\gamma$ -subunit were able to strongly inhibit the channel. Furthermore Ins1 cells treated with mSIRK (a membrane permeable peptide that induces a release of  $\beta\gamma$ -subunits) showed a strong reduction of the TRPM3 activity. Additional experiments with  $\beta\gamma$ -scavenging peptides (myr-phosducin or myr- $\beta$ ARKct) also led to a reduction of the inhibitory noradrenaline effect. A participation of PLC, PKC,  $\text{PLA}_2$  and soluble cytosolic factors in the signaling pathway that induces the inhibition of TRPM3 could be largely excluded in further experiments, indicating that  $\beta\gamma$ -subunits could perhaps directly induce the inhibition of the channel.

It turned out that not all TRPM3 splice variants show a  $\alpha_2$ -adrenoreceptor mediated inhibition or decrease of activity after overexpression of  $\beta\gamma$ -subunits. It seems that a sequence of 10 amino acids (coded by exon 17) is required for the channel inhibition, since splice variants without this sequence (TRPM3 $\alpha$ 4 and TRPM3 $\alpha$ 5) were insensitive to  $\alpha_2$ -adrenoreceptor mediated inhibition and overexpression of  $\beta\gamma$ -subunits and showed no reduction of the channel activity.

This study clearly shows that TRPM3 is strongly regulated by  $\alpha_2$ -adrenoreceptors in  $\beta$  cells. Indicating that TRPM3 may play an important part in pancreatic  $\beta$  cells which necessitates strict sympathetic regulation. The results obtained in this study contribute to a better understanding of the function of TRPM3 in  $\beta$  cells. Furthermore, the discovery that TRPM3 can be modulated via  $G\alpha_{i/o}$ -coupled GPCR provides a basis for further investigation of the role, function and regulation of TRPM3 in other tissues.

## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	3
Summary .....	5
Inhaltsverzeichnis.....	7
1. Einleitung .....	10
1.1 TRP-Kanäle .....	10
1.2 TRPM-Unterfamilie.....	13
1.3 TRPM3 .....	14
1.4 Pankreas und Langerhans-Inseln .....	17
1.5 $\beta$ -Zellen und Insulinfreisetzung .....	19
1.6 GPCR.....	21
1.7 G-Proteine .....	22
1.8 $G\alpha$ -Untereinheiten .....	23
1.9 $\beta\gamma$ -Untereinheiten .....	24
1.10 Regulation der Insulinfreisetzung durch GPCR .....	25
1.11 Wirkung von Noradrenalin auf pankreatische $\beta$ -Zellen .....	27
1.12 TRPM3 in pankreatischen $\beta$ -Zellen .....	29
1.13 Regulation von TRP-Kanälen durch GPCR .....	30
2. Fragestellung.....	33
3. Material und Methoden .....	34
3.1 Zellkultur .....	34
3.2 Transfektionen .....	35
Auflistung der durchgeführten Transfektionen .....	36
3.3 Präparation pankreatischer $\beta$ -Zellen der Maus .....	37
3.4 Fluoreszenzmessungen .....	39
$Ca^{2+}$ -Imaging mit Fura-2.....	39
Aufbau und Steuerung des Messstandes .....	40
Beladen der Zellen mit Fura-2/AM .....	41
Durchführung der $Ca^{2+}$ -Imaging Experimente .....	42
Analyse und Auswertung der Fluoreszenzmessungen.....	42
TIRFM- (total internal reflection fluorescence microscopy) Messungen .....	43
Der TIRF-Messstand .....	44

Durchführung der TIRF-Experimente.....	44
Analyse und Auswertung der TIRF-Experimente .....	45
3.5 Elektrophysiologie .....	45
Patch-Clamp Technik.....	45
Der Messstand .....	46
Whole-Cell Messungen.....	47
Cell-Attached Messungen .....	47
Giant Excised Patch .....	49
Präparation der Oocyten .....	49
cRNA Injektion .....	50
„Giant Excised Patch“ Messstand.....	51
Durchführung der „Giant Excised Patch“ Messungen .....	52
Analyse und Auswertung der Patch-Clamp Experimente .....	53
3.6 Molekularbiologie .....	54
3.7 Statistik.....	57
3.8 Lösungen .....	57
Lösungen für die $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging und Patch-Clamp Experimente .....	57
Lösungen für die „Giant Patch“-Experimente.....	58
Stocklösungen .....	59
4. Ergebnisse .....	60
4.1 Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Signalwegen führt zu einer Inhibierung von TRPM3.....	60
4.2 Noradrenalin inhibiert TRPM3 in primären $\beta$ -Zellen der Maus und in Ins1 Zellen .....	62
4.3 Die Inhibierung von TRPM3 durch Noradrenalin wird über $\alpha_2$ -Adrenorezeptoren vermittelt .....	65
4.4 Dem Noradrenalin-Effekt liegt ein $\text{G}\alpha_i/\text{G}\alpha_o$ -gekoppelter Signalweg zugrunde.....	69
4.5 Auch andere $\text{G}\alpha_i$ -, $\text{G}\alpha_o$ -gekoppelte GPCR sind in der Lage, eine Inhibition der TRPM3-Aktivität zu vermitteln.....	72
4.6 Die Inhibierung von TRPM3 wird nicht über den „klassischen“ $\text{G}\alpha_i$ -Signalweg vermittelt.....	75
4.7 Die TRPM3 Inhibition ist „Membran delimitiert“ und somit unabhängig von löslichen „second messengern“ .....	79
4.8 Aktive $\text{G}\alpha_i$ - oder $\text{G}\alpha_o$ -Untereinheiten sind für die TRPM3-Hemmung nicht ausreichend .....	81
4.9 Überexpression von $\beta\gamma$ -Untereinheiten führt zu einer verminderten PS-Antwort.....	84
4.10 Expression von $\beta\gamma$ -Scavengern schwächt den Noradrenalin-Effekt ab .....	88
4.11 Freisetzung von $\beta\gamma$ -Untereinheiten durch mSIRK hemmt die TRPM3-Aktivität .....	91



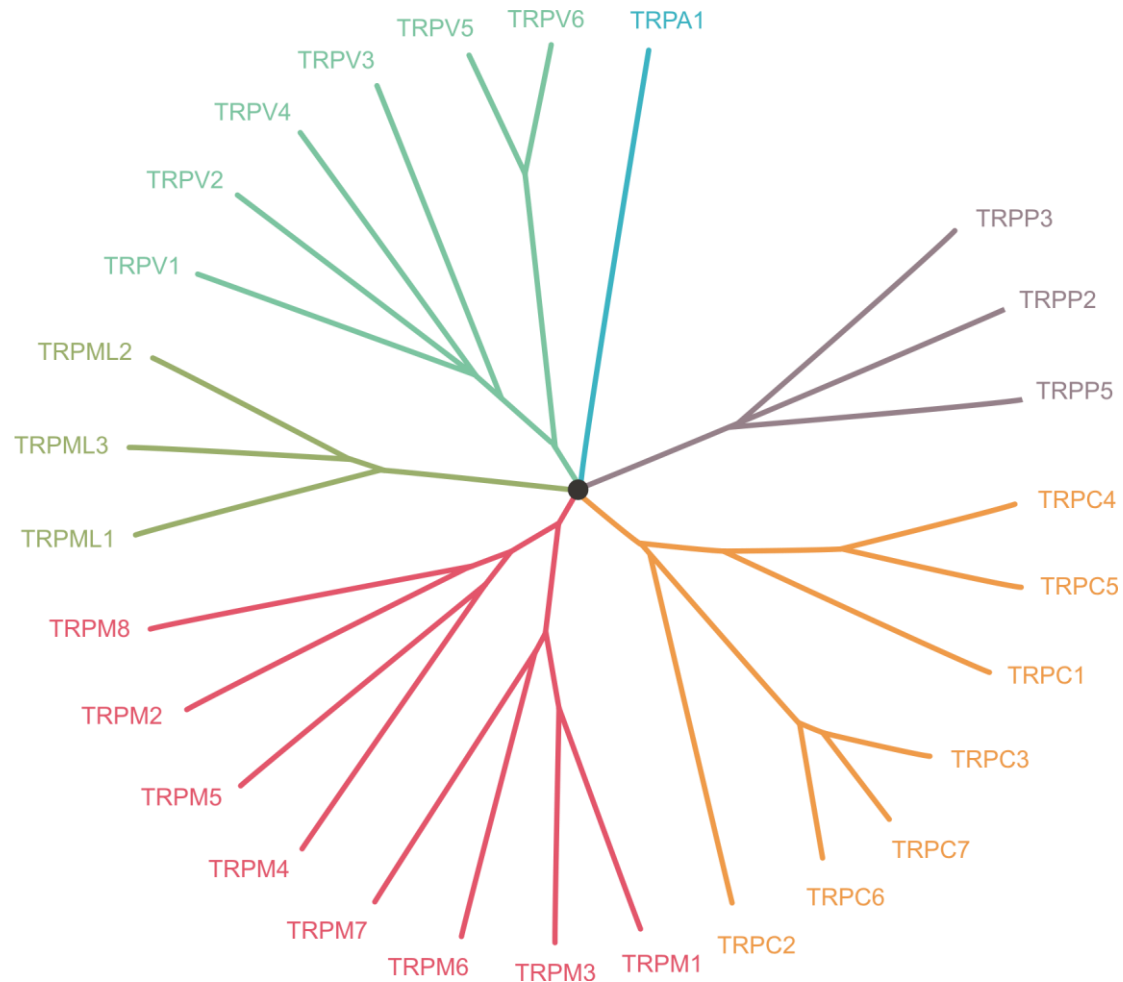
4.12 Die TRPM3-Inhibition ist unabhängig von der PIP <sub>2</sub> -Konzentration und der PKC-Aktivität .....	93
4.13 Die Inhibition der TRPM3-Aktivität durch Noradrenalin wird nicht durch PLA <sub>2</sub> vermittelt. ....	97
4.14 Die G-Protein vermittelte Inhibition der TRPM3-Aktivität ist unabhängig von cytosolischen Komponenten .....	98
4.15 Der Noradrenalin- und $\beta\gamma$ -Effekt auf TRPM3 ist Spleißvarianten spezifisch .....	101
4.16 Überexpression von $\beta\gamma$ -Untereinheiten führt zu einer Inhibition der TRPM1 $\Delta$ Ex11-Aktivität.....	104
5. Diskussion .....	107
5.1 Diskussion und Interpretation der Ergebnisse.....	107
5.2 Mögliche Rolle und Funktion von TRPM3 in pankreatischen $\beta$ -Zellen.....	119
5.3 Ausblick und weiterführende Experimente .....	120
6. Literaturverzeichnis.....	124
7. Danksagung .....	140
8. Veröffentlichungen .....	141
9. Verzeichnis der akademischen Lehrer .....	142

## 1. Einleitung

Signaltransduktion ist ein fundamentaler biologischer Prozess, der unerlässlich ist für den Erhalt der zellulären Homöostase und einer koordinierten zellulären Aktivität in allen Organismen. Membranproteine bzw. Membranrezeptoren an der Zelloberfläche dienen dabei als Kommunikationsschnittstelle zwischen dem Inneren und Äußeren der Zelle und fungieren als Mediator für viele extrazelluläre Stimuli. Membranrezeptoren lassen sich in metabotrope und ionotrope Rezeptoren gliedern. Eine Aktivierung von metabotropen Rezeptoren zieht immer eine Aktivierung einer intrazellulären Signalkaskade nach sich, die letztendlich den entsprechenden Effekt vermittelt. Zu der Klasse der metabotropen Rezeptoren gehören unter anderem G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR), wie die Adrenorezeptoren. Bei ionotropen Rezeptoren handelt es sich um Ionenkanäle, die nach Bindung eines Liganden (ligandengesteuerte Ionenkanäle) aktiviert werden und dann einen Ein- bzw. Ausstrom bestimmter Ionen gewährleisten. Ionotrope Rezeptoren sind somit sowohl Rezeptor als auch Effektor. Der in der vorliegenden Arbeit untersuchte TRPM3-Kanal gehört zu dieser Rezeptorklasse. Neben den ligandengesteuerten Ionenkanälen existieren noch spannungsgesteuerte Ionenkanäle, deren Aktivität nicht durch Bindung eines Liganden, sondern durch eine Veränderung der Membranspannung moduliert wird, und mechanosensitive Ionenkanäle [Hille 2001]. Weiterhin gibt es ligandengesteuerte Ionenkanäle, die eine zusätzliche Spannungsabhängigkeit aufweisen (beispielsweise TRPM4) [Nilius et al. 2003].

### 1.1 TRP-Kanäle

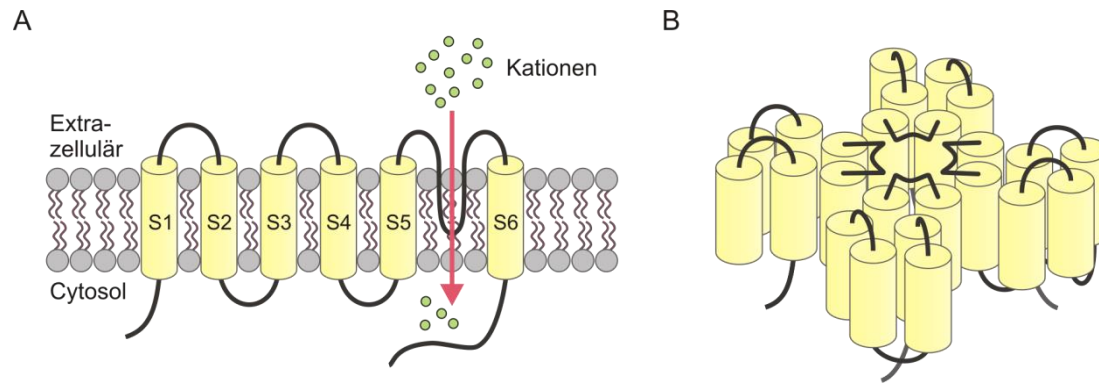
Unter TRP-Kanälen (transient receptor potential) versteht man eine Familie von Ionenkanälen, die in Hefen, Invertebraten und Säugern zu finden sind [Nilius et al. 2011]. Die Entdeckung der TRP-Kanäle geht auf eine Studie am visuellen System der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* zurück, in der eine Fliegenmutante identifiziert wurde, die während eines Elektroretinogramms auf einen konstanten Lichtstimulus nur eine transiente Spannungsantwort zeigte. Der Wildtyp hingegen zeigte eine stetige Spannungsantwort [Cosens & Manning 1969]. 20 Jahre später gelang es schließlich das verantwortliche *trp*-Gen zu identifizieren [Montell & Rubin 1989]. Der beobachtete



**Abbildung 1-1: Phylogenetischer Stammbaum der humanen TRP-Kanäle. Humane TRP-Kanäle werden in sechs Unterfamilien unterteilt.** Bei TRPC2 handelt es sich beim Menschen um ein Pseudogen. Um die genetische Verwandtschaft zu demonstrieren, wurde die TRPC2 Sequenz der Maus verwendet. Die Grafik wurde nach Nilius & Owsianik (2011) abgewandelt.

Phänotyp der Fliegenmutante wurde namensgebend für die gesamte Ionenkanalklasse.

Das Säuger genom kodiert für 28 TRP-Kanäle, die in sechs Unterfamilien eingeteilt werden (siehe Abb. 1-1). Sie werden in TRPM- (Melastatin), TRPC- (Canonische), TRPA- (Ankyrin), TRPV- (Vanniloid), TRPML- (Mucolipin) und TRPP- (Polycystin) Kanäle gegliedert [Clapham 2003; Clapham 2007; Nilius & Owsianik 2011]. TRP-Kanäle werden in fast allen Zelltypen exprimiert und kommen in den meisten zellulären Membranen vor. Die meisten TRP-Kanäle sind jedoch in der Plasmamembran lokalisiert [Nilius et al. 2011]. Allen TRP-Kanälen ist gemein, dass sie vermutlich sechs Transmembran-domänen besitzen, mit einem zwischen Domäne fünf und sechs liegenden porenformenden Loop, und sich sowohl C-, als auch N-Terminus auf der zytosolischen Seite der Plasmamembran befinden. Es wird davon ausgegangen, dass sich TRPs, in



**Abbildung 1-2: Schematische Darstellung eines TRP-Kanals.** (A) Seitenansicht einer TRP-Kanal Untereinheit mit den 6 Transmembrandomänen und dem porenformendem Loop zwischen der fünften und sechsten Domäne. Sowohl N-, als auch C-Terminus befinden sich cytosolisch. Grafik wurde abgewandelt nach Clapham et al. (2001). (B) Vermutete tetramerische Zusammenlagerung eines TRP-Kanals. Grafik wurde abgewandelt nach Erler et al. (2004).

Analogie zu spannungsabhängigen  $K^+$ -Kanälen, als Tetramere zusammenlagern und so kationenselektive Ionenkanäle bilden (siehe Abb. 1-2). Die Zusammenlagerung zu Tetrameren konnte bereits für einige TRP-Kanäle nachgewiesen werden [Kedei et al. 2001; Hoenderop et al. 2003]. Eine weitere Besonderheit von vielen Mitgliedern der TRP-Familie ist, dass sie nicht nur Homotetramere bilden können, sondern sich auch mit anderen, meist nahe verwandten TRPs zu heteromultimeren Kanälen zusammenlagern können [Schaefer 2005; Lambert et al. 2011].

Alle bekannten TRP-Kanäle sind Kationenkanäle, wobei ihre Permeabilität bezüglich monovalenten und divalenten Kationen sehr stark zwischen den einzelnen Subtypen variiert [Clapham 2003; Clapham et al. 2005; Pedersen et al. 2005; Owsianik et al. 2006]. Die physiologischen Aufgaben von TRP-Kanälen sind breit gefächert und reichen von sensorischen Funktionen wie Schmerzwahrnehmung (z.B. TRPA1) und Temperaturwahrnehmung (z.B. TRPM8 und TRPV1), über homöostatische Funktionen (z.B.  $Mg^{2+}$ - und  $Ca^{2+}$ -Reabsorption durch TRPM6), bis hin zu diversen weiteren Funktionen (z.B. Erhalt der endosomalen-, lysosomalen Funktion durch TRPML1) in den unterschiedlichsten Prozessen [Piper & Luzio 2004; Nilius & Owsianik 2011]. Ebenso vielseitig wie die physiologischen Funktionen sind auch die Stimuli, die zur Aktivierung von TRP-Kanälen führen. Zum einen gibt es eine Vielzahl chemischer Substanzen, oftmals pflanzlichen Ursprungs [Vriens et al. 2008], die TRP-Kanäle aktivieren, andererseits gehören auch intra- und extrazelluläre Botenstoffe, Temperatur, Änderung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration und mechanische Stimuli zu dem

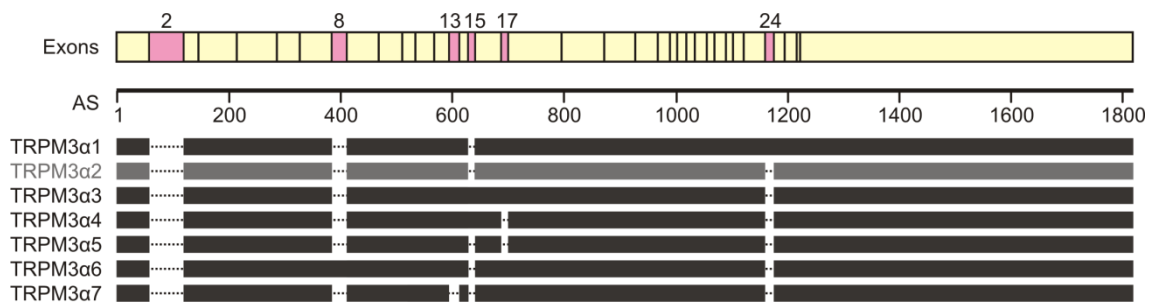
vielfältigen Spektrum der TRP-Aktivatoren. Besonders beachtenswert ist weiterhin, dass einige TRP-Kanäle durch mehrere, grundverschiedene Mechanismen aktiviert werden können. Prominente Beispiele sind hierfür TRPV1 und TRPM8. Beide Kanäle können sowohl durch chemische Substanzen (z.B. Capsaicin für TRPV1 und Menthol für TRPM8) stimuliert werden als auch durch Änderung der Temperatur. TRPV1 wird dabei durch Hitze ( $> 43^{\circ}\text{C}$ ) und TRPM8 durch Kälte ( $< 23 - 28^{\circ}\text{C}$ ) aktiviert und somit spielen beide eine wichtige Rolle bei der Temperaturwahrnehmung [Venkatachalam & Montell 2007; Nilius & Owsianik 2011].

Trotz bereits zahlreicher Erkenntnisse über TRP-Kanäle konnte bisher nicht allen Mitgliedern dieser großen Ionenkanalfamilie eine eindeutige physiologische Funktion bzw. ein physiologischer, aktivierender Stimulus zugeordnet werden.

## **1.2 TRPM-Unterfamilie**

Mit acht Mitgliedern stellt die TRPM-Unterfamilie die größte Gruppe der TRP-Kanäle von Säugern dar. Aufgrund von Sequenzhomologien unterscheidet man vier weitere Untergruppen: TRPM1/TRPM3, TRPM2/TRPM8, TRPM4/TRPM5 und TRPM6/TRPM7. TRPM1 konnte als erster TRPM-Kanal identifiziert werden, wurde jedoch zunächst Melastatin benannt, da sich sein Expressionslevel umgekehrt zum metastatischen Potential einiger Melanomazelllinien verhielt und er ein möglicher Tumorsuppressor in Melanomazellen ist [Duncan et al. 1998; Pedersen et al. 2005]. Der Name Melastatin wurde dann später als Bezeichnung für die gesamte TRPM-Unterfamilie gewählt.

Trotz einiger grundsätzlicher Gemeinsamkeiten wie den sechs Membrandomänen und ihrer Fähigkeit, Ionen zu leiten, weisen die einzelnen Kanäle innerhalb der TRPM-Unterfamilie zum Teil sehr große Unterschiede bezüglich ihrer Funktion, Expression und Regulierung auf. So scheinen sie unter anderem an der Lichtantwort in ON-Bipolarzellen der Retina (TRPM1), der Regulation der Insulinfreisetzung in  $\beta$ -Zellen (TRPM2, TRPM3, TRPM5) [Wagner et al. 2008, Brixel et al. 2010; Uchida et al. 2011], der Immunantwort (TRPM4) [Vennekens et al. 2007], der Geschmackswahrnehmung (TRPM5) [Zhang et al. 2003; Kinnamon 2012],  $\text{Mg}^{2+}$ -Homeostase unter anderem in Darm und Niere (TRPM6, TRPM7) [Walder et al. 2002; Paravicini et al. 2012] und der bereits erwähnten Temperaturwahrnehmung (TRPM3, TRPM8) beteiligt zu sein [Vriens et al. 2011; Nilius & Owsianik 2011]. Bei TRPM2, TRPM6 und TRPM7 handelt es



**Abbildung 1-3: Schematische Darstellung einiger TRPM3 Spleißvarianten.** Spleißstellen sind farblich bzw. graphisch hervorgehoben. Die in der vorliegenden Arbeit überwiegend untersuchte Isoform TRPM3α2 ist in Grau dargestellt. Die Grafik wurde nach Frühwald et al. (2012) abgewandelt.

sich außerdem um sogenannte „chanzymes“, da sie an ihrem C-Terminus eine enzymatische Domäne besitzen [Venkatachalam & Montell 2007].

### 1.3 TRPM3

Bei TRPM3 handelt es sich um einen nichtselektiven Kationenkanal, der sowohl für monovalente, als auch divalente Kationen permeabel ist und starke auswärts-rectifizierende Ströme zeigt. Die Expression von TRPM3-Genen konnte im Gehirn [Grimm et al. 2003; Lee et al. 2003; Oberwinkler et al. 2005; Fonfria et al. 2006; Frühwald et al. 2012], im Rückenmark [Lee et al. 2003], im Plexus choroideus (für die Bildung von Gehirn- und Rückenmarksflüssigkeit zuständig) [Oberwinkler et al. 2005; Frühwald et al. 2012], in Hinterwurzelganglien und Trigeminalganglien [Nealen et al. 2003; Lechner et al. 2009; Vriens et al. 2011; Frühwald et al. 2012], im Auge [Oberwinkler et al. 2005; Frühwald et al. 2012; Hughes et al. 2012], der Niere [Grimm et al. 2003; Lee et al. 2003; Fonfria et al. 2006], der Hypophyse [Fonfria et al. 2006], in Fettgewebe [Fonfria et al. 2006], der Prostata [Fonfria et al. 2006], in Knochen [Fonfria et al. 2006], im Hoden [Lee et al. 2003], im Ovar [Grimm et al. 2003] und im Pankreas [Grimm et al. 2003; Fonfria et al. 2006; Wagner et al. 2008] gezeigt werden. Eine besonders starke Expression liegt im Gehirn vor.

Das TRPM3-Gen kodiert für eine Vielzahl von Kanalisformen, die aufgrund von alternativen Spleißen gebildet werden (siehe Abb. 1-3). Innerhalb der TRP Familie weist TRPM3 sogar die größte Zahl von Isoformen auf, die teilweise sehr stark biophysikalisch voneinander abweichen. TRPM3α2 unterscheidet sich beispielsweise von TRPMα1 durch das Fehlen von Exon 24, einem 12 Aminosäure langen Bereich in der Porenregion zwischen der fünften und sechsten Transmembranregion. Außerdem

befindet sich bei TRPM3 $\alpha$ 1 ein Alanin-Rest C-terminal des beschriebenen Bereiches, wohingegen TRPM3 $\alpha$ 2 einen Prolin-Rest an dieser Stelle aufweist. Ansonsten sind die beiden Isoformen identisch. Die Isoformen weisen jedoch unterschiedliche Eigenschaften auf. TRPM3 $\alpha$ 1 zeigt nur eine geringe Permeabilität für  $\text{Ca}^{2+}$ , wohingegen TRPM3 $\alpha$ 2 eine mehr als zehnmal höhere  $\text{Ca}^{2+}$ -Permeabilität und ein Vielfaches der  $\text{Mg}^{2+}$ -Permeabilität aufweist. Beide Spleißvarianten werden durch intrazelluläres  $\text{Mg}^{2+}$  inhibiert, aber nur TRPM3 $\alpha$ 2 wird durch extrazelluläre, monovalente Kationen geblockt [Oberwinkler et al. 2005]. Die Spleißvariante TRPM3 $\alpha$ 7, der Exon 13 fehlt, zeigt sogar keinerlei Ionenströme mehr und macht je nach untersuchtem Zelltyp bis zu 15 % der insgesamt exprimierten TRPM3-Kanäle aus. Die Expression von TRPM3 $\alpha$ 7 vermindert das Vorkommen anderer TRPM3-Isoformen an der Plasmamembran und reduziert den TRPM3-bedingten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom [Frühwald et al. 2012]. Durch alternatives Spleißen können also TRPM3-Kanäle mit stark unterschiedlichen Eigenschaften und Kationen-Permeabilität gebildet werden. In  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Spleißformen TRPM3 $\alpha$ 3-TRPM3 $\alpha$ 6 eine ähnliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Permeabilität wie TRPM3 $\alpha$ 2 aufweisen [Frühwald et al. 2012]. Weitere mögliche biophysikalische oder regulatorische Unterschiede wurden jedoch bisher nicht näher untersucht.

Die physiologische Funktion des TRPM3 ist in den meisten Geweben bis jetzt nur äußerst schlecht verstanden. In einigen Zelltypen konnte jedoch eine mögliche Funktion demonstriert werden. Vriens et al. konnten zeigen, dass TRPM3 durch Hitze aktiviert werden kann und in einer Subpopulation der dorsalen Hinterwurzelganglien (DRG Neuronen) exprimiert wird. TRPM3 Knock-Out Tiere zeigten klare Defizite bei der Wahrnehmung von hohen Temperaturen und der entzündungsbedingten Entwicklung einer Hitzeüberempfindlichkeit. Dies spricht dafür, dass TRPM3 in DRG Neuronen als Temperatursensor dient [Vriens et al. 2011]. In pankreatischen  $\beta$ -Zellen konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung von TRPM3 zu einer Verstärkung der glucoseinduzierten Insulinfreisetzung führt [Wagner et al. 2008]. Auf die Rolle von TRPM3 in  $\beta$ -Zellen wird in einem späteren Abschnitt (siehe 1.12) noch genauer eingegangen. Weiterhin wurde berichtet, dass TRPM3 die Kontraktion von glatten Muskelzellen positiv moduliert und eine Sekretion von Interleukin-6 vermindert [Naylor et al. 2010].

TRPM3 zeigt, überexprimiert in HEK293 Zellen, eine konstitutive Aktivität [Grimm et al. 2003; Lee et al. 2003; Oberwinkler 2005]. Weiterhin wurden einige Substanzen bzw.

Stimuli beschrieben, die neben der bereits erwähnten Hitze in der Lage sind, TRPM3 zu aktivieren.  $\beta$ -Cyclodextrin vermittelt eine Aktivierung, indem es Cholesterol in der Plasmamembran chelatiert (Cholesterol hingegen hemmt die TRPM3-Aktivität) [Naylor et al. 2010]. Eine TRPM3 aktivierende Wirkung wurde auch für D-Erythro-Sphingosin beschrieben [Grimm et al. 2005]. Wagner et al. konnten dies jedoch nicht bestätigen [Wagner et al. 2008]. Auch eine Aktivierung durch Applikation von hypoosmotischer Lösung wurde gezeigt [Grimm et al. 2003]. Das Dihydropyridin Nifedipin, eigentlich ein Blocker spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, aktiviert TRPM3 ebenfalls. Die Strukturverwandten Dihydropyridine Nimodipin, Nicardipin und Nitrendipin hingegen zeigen keine Wirkung [Wagner et al. 2008].

Der bis dato potenteste pharmakologische Stimulator ist das endogene Neurosteroid Pregnenolonsulfat (PS) [Wagner et al. 2008]. Als Neurosteroid wird es unter anderem in geringen Mengen im Nervensystem von Nerven- und Gliazellen aus Cholesterol gebildet. Die direkte Vorstufe ist das Pregnenolone [Schumacher et al. 2000]. PS aktiviert TRPM3-Kanäle schnell, reversibel und dosisabhängig. Dabei vermittelt es seine Wirkung nur von der extrazellulären Seite. Eine intrazelluläre PS-Applikation in Inside-Out Patch-Clamp Messungen induzierte keine TRPM3 Ströme. Bei Raumtemperatur aktiviert PS TRPM3-Einwärtsströme mit einem  $\text{EC}_{50}$  von 23  $\mu\text{M}$  [Wagner et al. 2008]. Im heterologen Überexpressionssystem konnte gezeigt werden, dass bei 37 °C bereits 100 nM PS einen deutlichen TRPM3-bedingten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom induzieren kann [Vriens et al. 2011]. Um in  $\beta$ -Zellen einen erkennbaren Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu induzieren, waren 5  $\mu\text{M}$  PS notwendig. Zu beachten ist hierbei, dass die Experimente bei Raumtemperatur durchgeführt wurden [Wagner et al. 2008]. Es besteht somit die Möglichkeit, dass bereits geringere Mengen ein sichtbares  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal generieren. Die Konzentration von PS im Blutplasma Erwachsener liegt zwischen 200 und 400 nM (De Peretti & Mappus 1983; Havlíková et al. 2002] und somit deutlich unter 5  $\mu\text{M}$ . Frauen weisen jedoch während der Geburt einen deutlich erhöhten PS-Blutspiegel auf, der bis zu 5  $\mu\text{M}$  erreichen kann [Hill et al. 2002]. Ob es sich bei PS um einen physiologischen Aktivator des TRPM3 handelt und TRPM3 als ionotroper Steroid-Rezeptor dient, kann bisher nicht abschließend beantwortet werden. PS ist trotz alledem aufgrund seiner Wirkstärke und einfachen Handhabung ein ausgezeichnetes pharmakologisches Werkzeug, um TRPM3-Kanäle zu



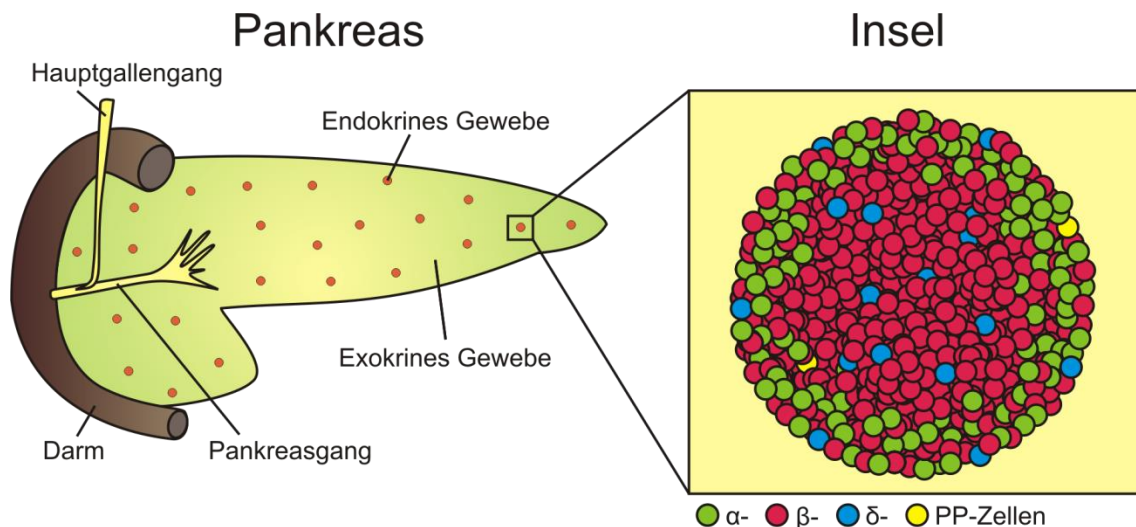
untersuchen. Neben den genannten Aktivatoren wurden auch einige TRPM3-Inhibitoren beschrieben. Eine Inhibition der TRPM3-Aktivität konnte für das Antidiabetikum Rosiglitazon [Majeed et al. 2011], das nichtsteroidale Antiphlogistikum Mefenaminsäure [Klose et al. 2011] sowie für Flavanone aus Zitrusfrüchten wie Naringenin und das Desoxybenzoin Ononetin [Straub et al 2013] gezeigt werden.

Da der Focus der vorliegenden Arbeit die Regulation von TRPM3 in pankreatischen  $\beta$ -Zellen ist, wird im Folgenden auf den Aufbau und die Funktion des Pankreas und im Besonderen auf  $\beta$ -Zellen und deren Regulation eingegangen.

#### **1.4 Pankreas und Langerhans-Inseln**

Das Pankreas ist ein Drüsenorgan, das sowohl aus exokrinem als auch aus endokrinem Gewebe besteht, wobei die exokrinen Acinuszellen den Großteil des Organs bilden. Die Acinuszellen sezernieren Verdauungsenzyme, die über den Pankreasgang in den Zwölffingerdarm abgegeben werden. Die freigegebenen Verdauungsenzyme spielen eine wichtige Rolle beim Aufschluss von Eiweißen, Kohlehydraten und Fetten im Darm und ermöglichen so deren Resorption über die Darmschleimhaut [Klinke & Silbernagl 2001]. Der endokrine Teil des Pankreas ist hingegen verantwortlich für die Regulation der Blutglucosekonzentration, und die von ihm freigesetzten Hormone spielen eine Schlüsselrolle bei der Aufrechterhaltung der Glucosehomöostase. Unter physiologischen Bedingungen liegt die nüchtern Blutglucosekonzentration bei Säugern bei etwa 5 mM. Eine dauerhafte Abweichung von diesem Wert kann fatale Folgen haben. Eine Hypoglykämie ist bereits innerhalb kürzester Zeit tödlich für Nervenzellen, wohingegen eine permanente Hyperglykämie zu Diabetes, einer verheerenden Krankheit führt, unter der weltweit mehr als 150 Millionen Menschen leiden [Soria et al. 2010].

Der endokrine Teil des Pankreas wird von den Langerhans-Inseln gebildet, die nach ihrem Entdecker Paul Langerhans benannt wurden. Sie machen etwa 1 % des gesamten Pankreas aus. Jede Insel besteht aus einer heterogenen Gruppe von 1000-3000 Zellen und setzt sich aus vier sekretorischen Zelltypen zusammen: den Insulin freisetzenden  $\beta$ -Zellen, den Glucagon freisetzenden  $\alpha$ -Zellen, den Somatostatin



**Abbildung 1-4: Schematische Darstellung des Pankreas und einer Langerhans-Insel der Maus.**

Der linke Teil der Grafik zeigt das gesamte Pankreas. Die roten Punkte stellen die Inseln dar, die von exokrinem Gewebe umgeben sind. Rechts ist eine vergrößerte Insel gezeigt. Die unterschiedlichen Zelltypen sind farblich markiert. Grafik wurde nach MacDonald & Rorsman (2006) abgewandelt.

freisetzen  $\delta$ -Zellen und den pankreatisches Polypeptid produzierenden PP-Zellen. Die in den Inseln produzierten Hormone werden direkt ins Blut abgegeben. Die am häufigsten vorkommenden Zelltypen in Inseln der Maus sind die  $\beta$ -Zellen (70-80 %), gefolgt von  $\alpha$ -Zellen (20 %) und  $\delta$ -Zellen (10 %). Die PP-Zellen stellen nur einen geringen Teil der Zellpopulation dar (1 %) [MacDonald & Rorsman 2006]. In Inseln der Maus ist weiterhin eine differenzierte räumliche Organisation der meist runden Inseln zu erkennen mit  $\beta$ -Zellen im Kern, umgeben von den übrigen Zelltypen (siehe Abb. 1-4). In menschlichen Inseln hingegen liegt diese differenzierte Organisation nicht vor. Weiterhin scheinen in menschlichen Inseln weniger  $\beta$ -Zellen, dafür aber mehr  $\alpha$ -Zellen vorhanden zu sein [Cabrera et al. 2006; MacDonald & Rorsman 2006; Soria et al. 2010]. Die Kontrolle der Glucosekonzentration im Blut hängt hauptsächlich von  $\beta$ - und  $\alpha$ -Zellen ab.  $\beta$ -Zellen sind verantwortlich für die Biosynthese, die Speicherung und Freisetzung von Insulin, einem Peptidhormon, das die Blutglucosekonzentration reguliert. Die Insulinfreisetzung erfolgt nach Nahrungsaufnahme und einem daraus resultierenden Anstieg der Glucose im Blut. Nachdem Insulin ins Blut freigesetzt wurde, bindet es in peripheren Geweben an spezifische Rezeptoren und initiiert unter anderem die Glucoseaufnahme in Muskel- und Fettgewebe und unterbindet die Gluconeogenese in der Leber. Der Großteil der Glucoseaufnahme geschieht in den Skelettmuskeln, in denen Glucose als Glycogen gespeichert wird. In Fettgewebe wird

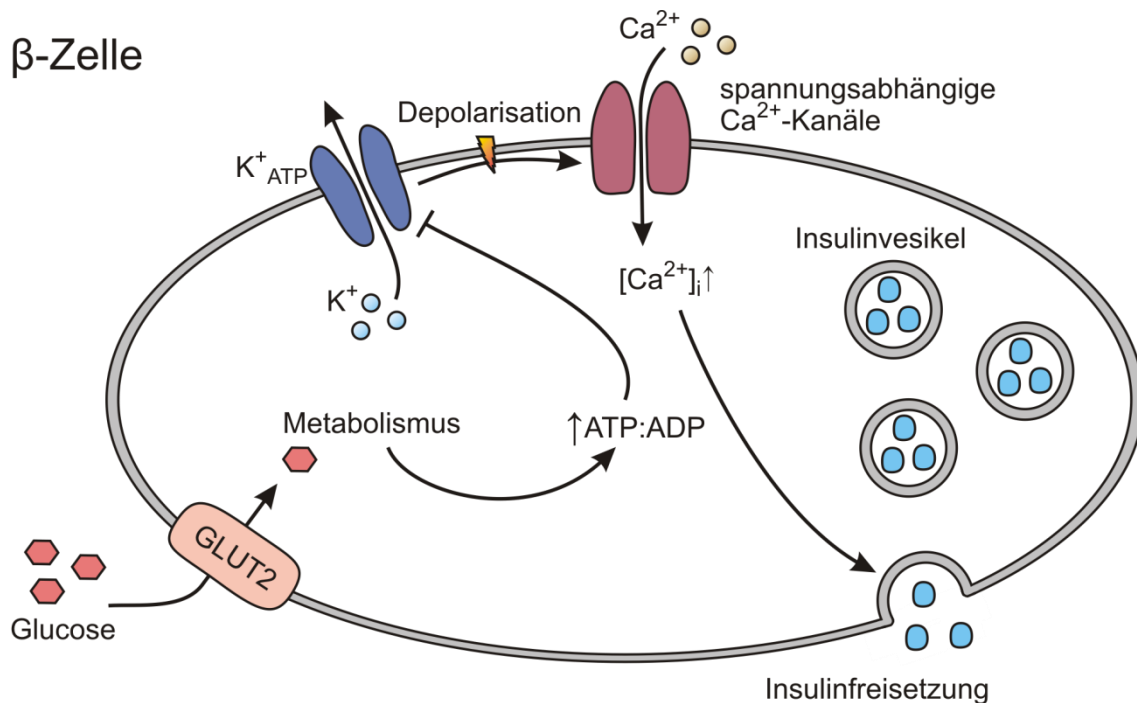
die aufgenommene Glucose hingegen in Triglyceride umgewandelt und gespeichert. Insulin bewirkt somit eine Erniedrigung des Blutglucosespiegels [Kraegen et al. 1985; Soria et al. 2010; Leto & Saltiel 2012].

Das von  $\alpha$ -Zellen sezernierte Glucagon kann als Gegenspieler des Insulins angesehen werden, da es die Freisetzung von Glucose aus peripheren Geweben induziert und somit zu einer Erhöhung der Glucosekonzentration im Blut führt. Die Freisetzung des Glucagon geschieht, im Gegensatz zur Insulinausschüttung unter hypoglykämischen Bedingungen [Jiang & Zhang 2003].

$\delta$ -Zellen üben einen indirekten Effekt auf die Blutglucosekonzentration aus, da das von ihnen freigesetzte Somatostatin über parakrine Mechanismen die Funktion von  $\beta$ - und  $\alpha$ -Zellen hemmt [Soria et al. 2010]. Ebenso hat das durch PP-Zellen freigesetzte pankreatische Polypeptid einen indirekten Effekt auf die Glucosekonzentration, indem es die Glucagonsekretion fördert [Yovos 2011].

### **1.5 $\beta$ -Zellen und Insulinfreisetzung**

$\beta$ -Zellen sind Blutglucosesensoren, die je nach detektierter Glucosekonzentration ihre Insulinausschüttung anpassen. Glucose gelangt dabei über den Glucosetransporter Glut-2 in die  $\beta$ -Zellen. Dieser Transporter sorgt für eine Equilibrierung der Glucosekonzentration zwischen dem Blut und den  $\beta$ -Zellen, so dass die Glucosekonzentration im Cytosol der Zellen der Konzentration im Blut entspricht. Durch die Metabolisierung der aufgenommenen Glucose wird ADP zu ATP umgewandelt. Mit steigender Glucosekonzentration erhöht sich somit die ATP-Konzentration, die ADP-Konzentration nimmt hingegen proportional ab. Die Änderung der ATP/ADP-Konzentration ist im Folgenden in der Lage, ATP-regulierte  $K^+$ -Kanäle ( $K_{ATP}$ ) zu inhibieren, indem ATP an die regulatorische SUR1 Untereinheit bindet [Ashcroft et al. 1984; Aittoniemi et al. 2009]. Bei niedriger Glucosekonzentration und damit auch geringer cytosolischer ATP-Konzentration sind die  $K_{ATP}$ -Kanäle geöffnet und führen durch einen stetigen  $K^+$ -Ausstrom zur Hyperpolarisation der  $\beta$ -Zellen. Die Glucose-induzierte Inhibierung der  $K_{ATP}$ -Kanäle zieht eine Depolarisation der Zellen nach sich, die durch noch weitgehend unbekannte Hintergrundströme vermittelt wird. Eine Beteiligung von TRPM5 an diesen Strömen wird gegenwärtig diskutiert. Der Kanal scheint einen entscheidenden Einfluss



**Abbildung 1-5: Schematische Darstellung der durch Glucose induzierten Insulinfreisetzung in β-Zellen.** Glucose gelangt über den Glut2-Transporter in die Zelle und wird dort metabolisiert. Die Folge ist ein Anstieg der ATP-Konzentration. ATP hemmt wiederum K<sub>ATP</sub>-Kanäle und es kommt zu einer Depolarisation der Plasmamembran. Dies führt zu einer Aktivierung von spannungsabhängigen Ca<sup>2+</sup>-Kanälen und Ca<sup>2+</sup> strömt in die Zelle. Der Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration induziert die Exocytose von insulinhaltigen Vesikel und somit eine Freisetzung von Insulin.

auf die Frequenz der Membrandepolarisation zu haben [Colsoul et al. 2010; Colsoul et al. 2013].

Die Depolarisation führt im Anschluss zu einer Aktivierung von spannungsabhängigen Ca<sup>2+</sup>-Kanälen und einem Einstrom von Ca<sup>2+</sup>-Ionen [Ashcroft & Rorsman 1989; Henquin 2000; Rorsman et al. 2011]. Die Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration wiederum löst die Exocytose der Insulinvesikel aus und Insulin wird freigesetzt (siehe Abb. 1-5) [Rorsman & Renström 2003]. Bei dem gerade beschriebenen Mechanismus der Insulinfreisetzung handelt es sich um den sogenannten auslösenden Signalweg („triggering pathway“). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass bei völlig geschlossenen K<sub>ATP</sub>-Kanälen eine Erhöhung der Glucosekonzentration trotzdem zu einer weiteren Verstärkung der Insulinfreisetzung führt. Dieser sogenannte verstärkende Signalweg („amplifying pathway“), der die Insulinausschüttung optimiert, ist somit unabhängig von den K<sub>ATP</sub>-Kanälen. Eine Voraussetzung dieses verstärkenden Signalwegs ist unter anderem eine bereits erhöhte intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration (bedingt durch den

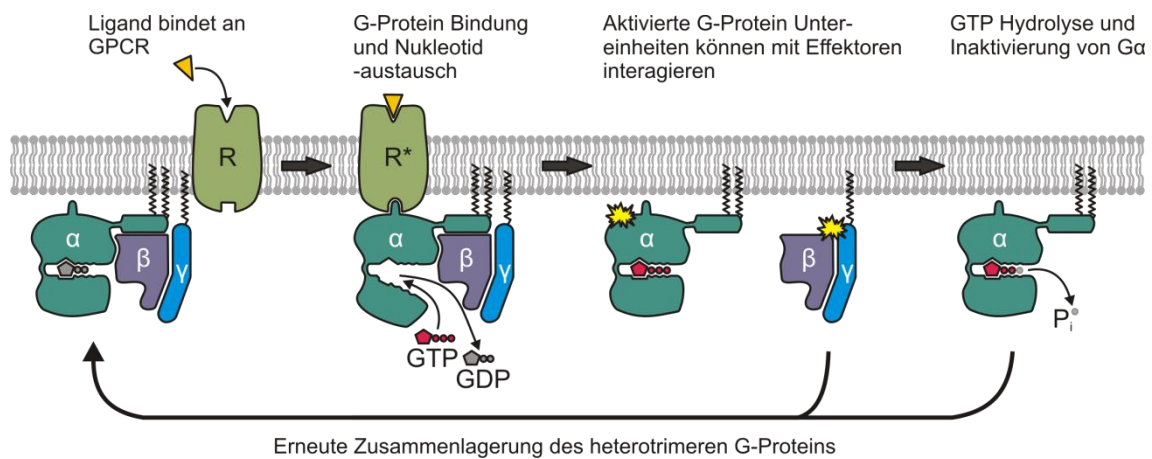
auslösenden Signalweg). Der verstärkende Signalweg tritt also erst in Erscheinung, nachdem der auslösende Signalweg die Depolarisation der Zelle und einen Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen induziert hat [Henquin 2000]. Wie genau der verstärkende Signalweg funktioniert, ist bis jetzt jedoch noch nicht verstanden. Das Vorhandensein des verstärkenden Signalwegs zeigt aber, dass die Insulinfreisetzung nicht alleine von  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanälen abhängig ist und noch weitere Faktoren an der Insulinfreisetzung beteiligt sein müssen.

Auch für einige TRP-Kanäle konnte bereits gezeigt werden, dass sie an der Insulinfreisetzung beteiligt sind. TRPM5-defiziente Mäuse und auch TRPM2-defiziente Mäuse zeigten beispielsweise beide eine gestörte Insulinfreisetzung [Colsoul et al. 2010; Uchida & Tominaga 2011; Colsoul et al. 2013].

Daneben gibt es noch eine Fülle von Signalwegen bzw. Mediatoren, die auf unterschiedliche Art und Weise die Insulinfreisetzung modulieren. Dabei handelt es sich überwiegend um Signalwege, an deren Anfang G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) stehen.

## **1.6 GPCR**

Bei GPCR handelt es sich um eine der größten Membranproteinfamilien, die durch mehr als 800 Gene im menschlichen Genom kodiert werden. GPCR sind in der Lage, ein breites Spektrum von externen Signalen, zum Beispiel Photonen, Ionen, kleine organische Moleküle und Proteine zu detektieren und kommen in nahezu jedem Zelltyp vor [Venkatakrisnan et al. 2013]. Nach Aktivierung durch einen entsprechenden Liganden vollzieht der GPCR eine Konformationsänderung, die letztendlich cytosolische Signalwege aktiviert und in einer zellulären Antwort resultiert. Trotz der großen Diversität der GPCR gibt es einige grundsätzliche Eigenschaften, die alle GPCR gemeinsam haben. Es handelt sich um metabotrope Rezeptoren mit sieben hydrophoben Transmembrandomänen, die die Plasmamembran in Form von  $\alpha$ -Helices durchspannen. Die Transmembrandomänen werden dabei durch hydrophile Schleifen verbunden, wobei sich der N-Terminus des Rezeptors extrazellulär und der C-Terminus intrazellulär befinden. Detaillierte Einsicht in die Struktur von GPCR konnte vor allem anhand von Röntgenstrukturanalysen an kristallisierten GPCR gewonnen werden [Palczewski et al. 2000; Rasmussen et al. 2007]. GPCR koppeln auf der Innenseite der



**Abbildung 1-6: Schematische Darstellung des G-Protein Aktivierungs-/Inaktivierungs-Zyklus.**

Ein extrazellulärer Ligand bindet an den GPCR und induziert eine Konformationsänderung des Rezeptors. Dies führt zu einem Austausch von GDP zu GTP an der  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins und einer Dissoziation der  $G\alpha$ - und  $\beta\gamma$ -Untereinheit. Die Untereinheiten befinden sich nun in einem aktivierten Zustand und können mit ihren entsprechenden Effektoren interagieren. Nach einer gewissen Zeit hydrolysiert die  $\alpha$ -Untereinheit das gebundene GTP zu GDP und die Untereinheiten lagern sich erneut zusammen. Das G-Protein befindet sich wieder in einem inaktiven Zustand. Die Grafik wurde nach Rasmussen et al. (2011) abgewandelt.

Membran an sogenannte G-Proteine. Diese wiederum fungieren als Vermittler zwischen dem Rezeptor und den eigentlichen Effektoren.

## 1.7 G-Proteine

G-Proteine bestehen aus drei Untereinheiten, einer  $\alpha$ -Untereinheit, die GTP bzw. GDP binden kann, einer  $\beta$ - und einer  $\gamma$ -Untereinheit. Im inaktiven Zustand (die  $G\alpha$ -Untereinheit hat GDP gebunden) liegen die drei Untereinheiten als Komplex vor. Nachdem ein Ligand an den GPCR bindet, kommt es zu einer Freisetzung des GDP von der  $G\alpha$ -Untereinheit und einer Bindung von GTP. Dadurch wird die  $G\alpha$ -Untereinheit in einen aktiven Zustand überführt, der zu einer Dissoziation der  $G\alpha$ -Untereinheit und der  $\beta\gamma$ -Untereinheit führt. Die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit bleiben als Komplex erhalten. Sowohl die  $G\alpha$ -Untereinheit als auch der  $\beta\gamma$ -Komplex können daraufhin mit verschiedenen membranständigen Effektoren interagieren. Die  $G\alpha$ -Untereinheit besitzt eine intrinsische GTPase Aktivität, die eine Hydrolyse von GTP zu GDP nach einer gewissen Zeit katalysiert. Im GDP gebundenen Zustand kann die  $G\alpha$ -Untereinheit wieder mit der  $\beta\gamma$ -Untereinheit reassoziieren und das G-Protein liegt wieder in einem inaktiven Zustand vor (siehe Abb. 1-6) [Aktories et al. 2005; Rasmussen et al. 2011]. Weiterhin kann die Hydrolysegeschwindigkeit von weiteren Faktoren moduliert

werden. So kann beispielsweise die GTP-Hydrolyse durch Regulatoren der G-Protein-Signaltransduktion (RGS) beschleunigt und somit die Aktivitätsdauer verkürzt werden [Magalhaes et al. 2012].

### **1.8 G $\alpha$ -Untereinheiten**

Bisher sind mehr als 20 Isoformen der G $\alpha$ -Untereinheiten bekannt, die aufgrund von Ähnlichkeiten in ihrer Aminosäuresequenz in vier Klassen eingeteilt werden (G $\alpha_s$ , G $\alpha_{i/o}$ , G $\alpha_{q/11}$  und G $\alpha_{12/13}$ ). Es ist üblich, die G-Proteine entsprechend ihrer  $\alpha$ -Untereinheit zu benennen [Strathmann & Simon 1991; Cabrera-Vera et al. 2003; Ellis et al. 2004; Blad et al. 2012]. Die meisten G $\alpha$ -Untereinheiten zeigen eine weitläufige Verbreitung in verschiedensten Geweben und nur einige wenige zeigen stark begrenzte Expressionsmuster (z. B. G $\alpha_t$  wird als ein Teil des Transducins überwiegend in Photorezeptoren der Retina exprimiert).

G $\alpha$ -Untereinheiten bestehen aus zwei Domänen: Einer GTPase Domäne, die an der Bindung und Hydrolyse von GTP beteiligt ist und einer helikalen Domäne. Diese weist innerhalb der G $\alpha$ -Familie die größten Unterschiede auf und spielt möglicherweise eine Rolle bei der Rezeptor- bzw. Effektor-Spezifität [Cabrera-Vera et al. 2003]. Der  $\beta\gamma$ -Komplex bindet an eine hydrophobe Tasche, die in der GDP-gebundenen Form der G $\alpha$ -Untereinheit vorzufinden ist. Durch den Austausch des GDP zu GTP verschwindet diese hydrophobe Tasche, wodurch die Affinität der G $\alpha$ -Untereinheit zum  $\beta\gamma$ -Komplex vermindert wird [Lambright et al. 1994]. Weiterhin interagiert die G $\alpha$ -Untereinheit über eine N-terminale Helix ( $\alpha$ N-Helix) mit der  $\beta$ -Untereinheit des  $\beta\gamma$ -Komplexes [Wall et al. 1995; Cabrera-Vera et al. 2003; Milligan & Kostenis 2006]. Fast ausnahmslos werden G $\alpha$ -Untereinheiten durch N-Myristoylierung und Palmitoylierung posttranslational modifiziert. Diese Lipid-Modifikationen sind essentiell für eine Verankerung der G $\alpha$ -Untereinheiten an der Plasmamembran [Chen & Manning 2001].

Nachdem die GTP-gebundene Form der G $\alpha$ -Untereinheiten vom  $\beta\gamma$ -Komplex dissoziiert ist, kann sie direkt mit Effektoren interagieren. Mit welchem Effektor-Protein die G $\alpha$ -Untereinheit interagiert, ist abhängig vom G $\alpha$ -Subtyp und jede G $\alpha$ -Familie interagiert mit einem bestimmten Set von Effektoren. Die molekulare Basis dieser Selektivität konnte bisher jedoch noch nicht vollständig entschlüsselt werden.

Gut untersuchte  $G\alpha$ -Effektoren sind die Adenylatcyclase (AC) und die Phospholipase  $C\beta$  (PLC $\beta$ ). Dabei führen  $G\alpha$ -Untereinheiten des  $G\alpha_s$ -Typs zu einer Aktivierung der AC, wohingegen ein Großteil der  $G\alpha_{i/o}$ -Familienmitglieder eine Inhibierung der AC induziert. Eine Aktivierung der AC führt zu einer Bildung von zyklischem AMP (cAMP) aus ATP und der intrazelluläre cAMP-Spiegel steigt. Durch cAMP wird wiederum (unter anderem) die Proteinkinase A (PKA) aktiviert, die daraufhin in der Lage ist, Zielproteine zu phosphorylieren. Eine Hemmung der AC (durch  $G\alpha_{i/o}$ ) erniedrigt somit den cAMP-Spiegel und die PKA-Aktivität. Die  $G\alpha_{q/11}$ -Familie aktiviert hingegen die PLC $\beta$  und stimuliert dadurch den Abbau von Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP $_2$ ) und die Entstehung der „second Messenger“ Inositoltrisphosphat (IP $_3$ ) und Diacylglycerol (DAG). Im Folgenden werden diese Signalwege als klassische Signalwege bezeichnet [Cabrera-Vera et al. 2003; Ellis et al. 2004]. Die Wirkung der einzelnen  $G\alpha$ -Untereinheiten ist jedoch nicht nur auf diese klassischen Signalwege beschränkt und auch innerhalb der einzelnen  $G\alpha$ -Familien können die einzelnen  $G\alpha$ -Subtypen mit unterschiedlichen Effektoren interagieren [Macrez-Leprêtre et al. 1997].

### **1.9 $\beta\gamma$ -Untereinheiten**

Fünf verschiedene  $G\beta$ -Untereinheiten und 12 unterschiedliche  $G\gamma$ -Untereinheiten konnten bis dato im menschlichen Genom und Mausgenom identifiziert werden. Die  $G\beta$ -Untereinheiten zeigen eine hohe Sequenzhomologie von über 80%, mit Ausnahme der  $G\beta_5$ -Untereinheit, die nur eine 50%ige Homologie aufweist. Die  $\gamma$ -Untereinheiten besitzen untereinander eine deutlich niedrigere Ähnlichkeit. Die unterschiedlichen Untereinheiten können sich als spezifische Pärchen in verschiedenen Kombinationen ( $G\beta_x\gamma_x$ ) zusammenlagern. Inwiefern die große Diversität, die sich aus den unterschiedlichen Kombinationsmöglichkeiten ergibt, auch eine funktionelle Rolle spielt, ist bis jetzt noch nicht gut verstanden [Smrcka 2008]. Ein Knock-Out der  $\gamma_3$ -Untereinheit im Mausmodell führte beispielsweise zwar zu einem ausgeprägten Phänotyp (reduziertes Körpergewicht und Krampfanfälle), da es jedoch zu einer gleichzeitigen Änderung der Expression weiterer G-Protein-Untereinheiten kam, ist eine Interpretation des Effekts äußerst schwierig [Schwindinger et al. 2004].

$\beta\gamma$ -Untereinheiten sind membrangebundene Proteine, die fast ausschließlich an der Plasmamembran vorzufinden sind. Wie die  $G\alpha$ -Untereinheiten unterlaufen die  $\gamma$ -



Untereinheiten einer posttranslationalen Modifikation. Sie werden durch Anfügen einer Farnesyl- oder Geranyl-Geranyl-Gruppe prenyliert und können so an die Plasmamembran binden. Die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit lagern sich über eine Coiled-Coil-Struktur fest zusammen und lassen sich nur unter denaturierenden Bedingungen voneinander trennen [Smrcka 2008].

Anfänglich wurde davon ausgegangen, dass der  $\beta\gamma$ -Untereinheit eine eher passive Rolle zukommt und es sich um eine Art negativen Regulator der  $G\alpha$ -Untereinheit handelt, der die Inaktivierung der  $G\alpha$ -Untereinheit beschleunigt und deren spontane Aktivierung einschränkt [Neer 1995]. Diese Vorstellung änderte sich grundlegend mit der Entdeckung, dass  $\beta\gamma$ -Untereinheiten in der Lage sind, einen G-Protein-gekoppelten einwärtsrektifizierenden Kalium-Kanal (GIRK) in Herzzellen zu aktivieren und somit sowohl die  $G\alpha$ -Untereinheit als auch der  $\beta\gamma$ -Komplex mit Effektoren interagieren können [Logothetis et al. 1987]. In darauffolgenden Studien konnten immer weitere Effektoren des  $\beta\gamma$ -Komplexes identifiziert werden. So konnte eine Aktivierung der  $PLC\beta_2$  [Camps et al. 1992; Wu et al. 1993], der Adenylatcyclase [Federman et al. 1992] und der bereits erwähnten G-Protein-gekoppelten einwärtsrektifizierenden Kalium-Kanälen (GIRK) [Logothetis et al. 1987; Sadjja et al. 2003; Whorton & MacKinnon 2013] nachgewiesen werden. Auch konnte eine Regulation von spannungsabhängigen  $Ca^{2+}$ -Kanälen (VGCC;  $Ca_v$ ) gezeigt werden. Dabei scheint eine direkte Interaktion der  $\beta\gamma$ -Untereinheiten mit der porenformenden Untereinheit von  $Ca_v2$ -Kanälen eine spannungsabhängige Inhibition zu induzieren [Currie 2010; Zamponi & Currie 2013]. Des Weiteren wurde eine Interaktion des  $\beta\gamma$ -Komplexes mit der  $\beta$ -Adrenorezeptorkinase (GRK2) gezeigt [Koch et al. 1993; Lodowski et al. 2003], eine durch  $\beta\gamma$ -Untereinheiten vermittelte Hemmung der Exocytose [Zhao et al. 2010] und sogar die Modulation von TRP-Kanälen (TRPV1 [Loo et al. 2012]; TRPA1 [Wilson et al. 2011]; TRPM1 [Shen et al. 2012]) durch  $\beta\gamma$ -Untereinheiten wurde beschrieben.

### **1.10 Regulation der Insulinfreisetzung durch GPCR**

Wie bereits erwähnt wird der insulinotrope Effekt von Glucose durch viele andere Faktoren moduliert. Diese Regulation dient der Optimierung und Feinabstimmung der Insulinfreisetzung und häufig sind GPCR beteiligt. Verallgemeinernd kann man sagen, dass in  $\beta$ -Zellen exprimierte GPCR, die  $G_s$ - bzw.  $G_{q/11}$ -gekoppelte Signalwege aktivieren,

eine Verstärkung der Insulinfreisetzung hervorrufen, wohingegen  $G_{i/o}$ -gekoppelte GPCR eine Verminderung induzieren [Ahrén 2009].

Neben  $Ca^{2+}$ , dem wichtigsten Faktor für die Insulinfreisetzung, hat cAMP einen bedeutenden Einfluss auf die Insulinfreisetzung in  $\beta$ -Zellen. Die Bildung von cAMP wird unter anderem stimuliert durch Incretine (Glucagon-Like-Peptid-1 (GLP1) und Glucose-dependent-insulinotropic-polypeptide (GIP)), indem sie ihre entsprechenden  $G_s$ -gekoppelten Rezeptoren aktivieren. Die Aktivierung der Rezeptoren führt zu einer Stimulierung der Adenylatcyclase und somit zu einer Erhöhung des cAMP-Spiegels, der eine Potenzierung der Insulinfreisetzung nach sich zieht. Die Insulinfreisetzung wird dabei auf mehreren Wegen moduliert. So werden beispielsweise durch die Erhöhung des cAMP-Spiegels und die daraus resultierende Aktivierung der PKA die Aktivität von spannungsabhängigen L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanälen potenziert und  $K_{ATP}$ -Kanäle werden inhibiert. Cyclisches AMP verstärkt die Insulinfreisetzung auch distal des  $Ca^{2+}$ -Signals, indem es die Vesikelmobilität und die Vesikelanzahl steigert [Ammälä et al. 1993; Holz et al. 1993; Kanno et al. 1998; Tengholm 2012].

Ein prominentes Beispiel für einen  $G_{q/11}$ -gekoppelten GPCR, der die Insulinfreisetzung stimuliert, ist der muscarinische M3-Rezeptor, der durch Acetylcholin aktiviert wird. Nach Ligandbindung aktiviert der M3-Rezeptor bestimmte Isoformen der Phospholipase  $\beta$ , die die Spaltung von  $PIP_2$  zu  $IP_3$  und DAG katalysiert.  $IP_3$  öffnet daraufhin Kationenkanäle ( $IP_3$ -Rezeptoren) im endoplasmatischen Reticulum und induziert so die Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus den intrazellulären Speichern. Die auf diese Weise generierte Erhöhung der cytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration fördert die Vesikelfusion und somit die Insulinfreisetzung. DAG ist in der Lage bestimmte Isoformen der PKC zu aktivieren, die wiederum die Effizienz der Vesikelexocytose steigern, indem die Sensitivität des sekretorischen Apparates für  $Ca^{2+}$  erhöht wird. Die PKC-abhängige Stimulation der Insulinfreisetzung ist jedoch nur bei erhöhter cytosolischer  $Ca^{2+}$ -Konzentration zu beobachten [Gilon & Henquin 2001; Ruiz de Azua et al. 2011]. Außerdem kommt es unter anderem zu einer Aktivierung eines  $Na^+$ -Einwärtsstroms, der zur Depolarisation der  $\beta$ -Zellen beiträgt [Swayne et al. 2009].

$G_{\alpha_{i/o}}$ -gekoppelte GPCR wirken durch Hemmung der Adenylatcyclase allen durch Erhöhung des cAMP-Spiegels induzierten, die Insulinfreisetzung fördernden Mechanismen, entgegen. Allerdings modulieren  $G_{\alpha_{i/o}}$ -gekoppelte GPCR in  $\beta$ -Zellen

noch weitere Mechanismen, so dass die Insulinfreisetzung auf vielen Wegen herabgesetzt wird. Einer der wichtigsten  $G\alpha_{i/o}$ -gekoppelten Signalwege, der die Insulinfreisetzung moduliert, wird durch Noradrenalin induziert. Im Folgenden wird, da die noradrenerge Regulation der pankreatischen  $\beta$ -Zellen einen zentralen Teil der vorliegenden Arbeit darstellt, genauer auf die inhibitorische Wirkung von Noradrenalin auf  $\beta$ -Zellen eingegangen.

### **1.11 Wirkung von Noradrenalin auf pankreatische $\beta$ -Zellen**

Noradrenalin ist verantwortlich für eine Vielzahl von Effekten im menschlichen Körper. Es spielt unter anderem eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Herzkreislaufsystems, der Leber, der Muskeln, des Fettgewebes und des gesamten Metabolismus. Es fungiert als Hormon, nachdem es zusammen mit Adrenalin aus dem Nebennierenmark freigesetzt wurde, und als Neurotransmitter, wenn es durch das zentrale oder sympathische Nervensystem freigegeben wird [Straub & Sharp 2012]. Pankreatische Inseln werden sowohl durch parasympathische, als auch sympathische Nerven innerviert. Die Nervenendigungen bilden jedoch keine klassischen Synapsen mit den Inselzellen, sondern geben ihre Neurotransmitter eher in räumlicher Nähe der Zellen frei. Der Verlauf der Nervenbahnen orientiert sich überwiegend an dem der Atreriolen, die die Inseln versorgen [Ahrén 2000; Taborsky 2010]. Folglich erreicht Noradrenalin die  $\beta$ -Zellen entweder über die Blutversorgung oder durch Freisetzung aus sympathischen Nervenendigungen. Neueste Studien konnten jedoch zeigen, dass es anscheinend größere Unterschiede zwischen der Innervierung von  $\beta$ -Zellen der Maus und des Menschen gibt. Bei der Maus scheinen die Inselzellen sowohl durch sympathische, als auch parasympathische Axone innerviert zu werden, wohingegen beim Menschen die endokrinen Inselzellen kaum innerviert werden und eher das Gefäßsystem der Inseln sympathisch innerviert wird [Rodriguez-Diaz et al. 2011]. Den ersten Hinweis, dass Noradrenalin eine regulatorische Wirkung auf  $\beta$ -Zellen ausübt, erhielt man aufgrund einer Studie aus dem Jahre 1966. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Noradrenalin die Glucose-induzierte Insulinfreisetzung im Menschen hemmt und somit einen direkten Effekt auf die pankreatischen  $\beta$ -Zellen ausübt [Porte & Williams 1966].

Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass die inhibitorische Wirkung des Noradrenalin über  $G_i$ - und  $G_o$ -gekoppelte  $\alpha_2$ -Adrenorezeptoren vermittelt wird. Es existieren drei Subtypen des Rezeptors ( $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  und  $\alpha_{2C}$ ), die alle in menschlichen Inselzellen exprimiert werden [Kutlu et al. 2009]. Die Inhibition der Insulinfreisetzung wird dabei durch den  $\alpha_{2A}$ -Subtyp vermittelt, aber auch eine Beteiligung des  $\alpha_{2C}$ -Adrenorezeptors konnte in Knock-Out Mäusen gezeigt werden [Angel et al. 1990; Peterhoff et al. 2003; Fagerholm et al. 2004; Fagerholm et al. 2011; Straub & Sharp 2012]. Der  $\alpha_{2A}$ -Subtyp wird jedoch als Hauptmediator des inhibitorischen Effekts angesehen und wird in  $\beta$ -Zellen von Mäusen sehr stark exprimiert [Regard et al. 2007]. Eine Rolle des  $\alpha_{2B}$ -Subtyps konnte in keiner Studie nachgewiesen werden.

Noradrenalin vermittelt drei Haupteffekte auf  $\beta$ -Zellen, die eine Verminderung der Insulinausschüttung nach sich ziehen. Es aktiviert  $K^+$ -Kanäle, es induziert eine Inhibition der Adenylatcyclase und hemmt die Exocytose von Insulinvesikel (Distaler Effekt) [Straub & Sharp 2012].

Aktivierung von  $\alpha_{2A}$ -Adrenorezeptoren in  $\beta$ -Zellen führt zu einem gesteigerten  $K^+$ -Ausstrom und einer Hyperpolarisation der Zellen. Diese Hyperpolarisation verhindert bzw. reduziert die Aktivierung von spannungsabhängigen  $Ca^{2+}$ -Kanälen (L-Typ) und damit eine Freisetzung von Insulinvesikel. Welche  $K^+$ -Kanäle bei der  $\alpha_{2A}$ -Adrenorezeptor vermittelten Hyperpolarisation beteiligt sind, ist jedoch noch nicht abschließend geklärt. Es gibt Hinweise, die daraufhin deuten, dass  $K_{ATP}$ -Kanäle reaktiviert werden (Sulfonylharnstoff sensitiv) [Zhao et al. 2008], aber auch die Involvierung von GIRK-Kanälen konnte gezeigt werden (Sulfonylharnstoff unsensitiv) [Rorsman et al 1991; Iwanir & Reuveny 2008].

$\alpha_{2A}$ -Adrenorezeptoren sind wie bereits erwähnt  $G\alpha_i$ -/ $G\alpha_o$ -gekoppelte GPCR und vermitteln eine Hemmung der Adenylatcyclase. Folglich wirkt Noradrenalin allen cAMP-abhängigen Effekten entgegen. Somit wird eine Potenzierung der spannungsabhängigen L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanäle und eine Inhibition der  $K_{ATP}$ -Kanälen verhindert. Ebenso wird der cAMP-vermittelten Steigerung der Vesikelmobilität und Vesikelanzahl entgegengesteuert [Straub & Sharp 2012].

Studien am Mausmodell zeigten, dass die Stimulation von  $\alpha_2$ -Adrenorezeptoren in  $\beta$ -Zellen nicht zur direkten Hemmung von L-Typ spannungsabhängigen  $Ca^{2+}$ -Kanälen führt [Bokvist et al. 1991] und somit ist die verminderte Aktivität der L-Typ

spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen nach Noradrenalin Applikation nur ein Resultat der durch  $\text{K}^+$ -Kanäle-bedingten Hyperpolarisation bzw. der verminderten PKA-vermittelten Potenzierung der Kanalaktivität.

Die Inhibition der Exocytose erfolgt hauptsächlich durch  $\beta\gamma$ -Untereinheiten, die nach Aktivierung des  $\alpha_2$ -Adrenorezeptors freigesetzt werden.  $\beta\gamma$ -Untereinheiten interagiert dabei mit dem SNARE-Komplex des Fusionsapparates an einer Stelle, die für die Interaktion des Komplexes mit Synaptotagmin essentiell ist. Die Hemmung der Vesikelexocytose wird also durch eine Entkopplung des SNARE-Komplexes vom  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensor Synaptotagmin hervorgerufen [Blackmer et al. 2005; Zhao et al. 2010].

Noradrenalin vermittelt seine inhibitorische Wirkung somit durch eine beachtenswerte Diversität an Mechanismen und reguliert alle wichtigen Schlüsselkomponenten der Insulinfreisetzung. Es konnte gezeigt werden, dass ein Polymorphismus im humanen  $\alpha_{2A}$ -Adrenorezeptor Gen (*ADRA2A*), der zu einer Überexpression des Rezeptors führt, eine verminderte Insulinfreisetzung und ein erhöhtes Diabetes Typ II Risiko nach sich zieht [Rosengren et al. 2010]. Dies unterstreicht, welchen großen Einfluss Noradrenalin bzw. die sympathische Innervierung auf die Insulinfreisetzung in  $\beta$ -Zellen hat. Eine Überfunktion, sei es seitens des Rezeptors oder der sympathischen Stimulierung, beeinträchtigt schwerwiegend die normale physiologische Funktion der  $\beta$ -Zellen.

### 1.12 TRPM3 in pankreatischen $\beta$ -Zellen

Wie bereits erwähnt, konnte eine funktionelle Expression von TRPM3-Kanälen in Inselzellen des Pankreas gezeigt werden. Die Expression von TRPM3 konnte mittels RT-PCR und Western-Blot sowohl in primären Inselzellen der Maus als auch in Ins1 Zellen, eine Insulinomazelllinie, die von einer Ratte abstammt, nachgewiesen werden [Wagner et al. 2008; Klose et al. 2011; Mayer et al. 2011]. PS induzierte in primären  $\beta$ -Zellen TRPM3 typische, stark auswärtsrektifizierende Ströme.  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging Experimente kombiniert mit Immunfärbungen mit primären Inselzellen der Maus konnten weiterhin belegen, dass nur Insulin positive Zellen, also  $\beta$ -Zellen, sensitiv für den TRPM3-Agonisten PS sind. Glucagon positive  $\alpha$ -Zellen hingegen zeigten keine PS-Antwort. Das durch PS induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal zeigte, im Gegensatz zum Glucose induzierten Signal, keine Oszillationen. Auch Nifedipin führt eine solide Aktivierung von TRPM3 in primären Inselzellen der Maus herbei. In Ins1 Zellen konnte weiterhin mit Hilfe eines

spezifischen Knock-Downs von TRPM3 die durch PS induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale signifikant reduziert werden. PS konnte in Konzentrationen von 35 bzw. 50  $\mu\text{M}$  die Glucose-induzierte Insulinfreisetzung signifikant erhöhen. Bei niedrigen Glucose Konzentrationen (3 mM) wurde hingegen keine signifikante Erhöhung beobachtet [Wagner et al. 2008]. In Untersuchungen mit TRPM3 Knock-Out Mäusen konnte im Vergleich zu Wildtyp-Tieren kein Unterschied bezüglich des Ruhe Blutglucoselevels festgestellt werden [Vriens et al. 2011]. Dies spricht dafür, dass TRPM3, zumindest in gesunden Tieren unter normalen Bedingungen, nicht essentiell für die Aufrechterhaltung der Glucose-Homöostase bzw. Insulinfreisetzung notwendig ist. Ob die TRPM3 Knock-Out Tiere eine Veränderung der Blutglucose bzw. der Insulinfreisetzung unter Stressbedingungen, wie zum Beispiel während einer Hochfettdiät, aufweisen, wurde bisher jedoch nicht näher untersucht. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass PS in Ins1 Zellen eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Veränderung der Gen-Transkription induziert. Der beobachtete Effekt war in Anwesenheit von niedrigen Glucosekonzentrationen TRPM3 abhängig. Die eingeleitete Gen-Transkription führte zu einer verstärkten Insulinexpression [Mayer et al. 2011; Thiel et al. 2013]. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass TRPM3 permeabel für  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen ist und eine regulierte  $\text{Zn}^{2+}$ -Aufnahme in pankreatischen  $\beta$ -Zellen vermittelt [Wagner et al. 2010].

### **1.13 Regulation von TRP-Kanälen durch GPCR**

Eine Regulation durch GPCR ist bereits für viele Mitglieder der TRP-Kanal-Familie gezeigt worden. Der erste TRP-Kanal, für den eine GPCR vermittelte Regulation gezeigt werden konnte, ist der TRP-Kanal der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (der erste identifizierte TRP-Kanal). Die Aktivierung dieses  $\text{Ca}^{2+}$ -permeablen Kationenkanals ist dabei ausschließlich abhängig von der Stimulation der PLC [Montell 2012]. Der TRP-Kanal spielt eine essentielle Rolle bei der visuellen Signaltransduktion im Facettenauge der Fruchtfliege. Bei der Lichtwahrnehmung wird Rhodopsin (bestehend aus dem GPCR Opsin, verbunden mit einem Chromophor) durch Licht aktiviert und aktiviert wiederum ein heterotrimeres G-Protein ( $\text{G}_q$ ), welches anschließend die PLC stimuliert. Dies führt letztendlich zur Aktivierung des TRP-Kanals. Es ist jedoch nicht abschließend geklärt, wie genau die Aktivierung der PLC letztendlich die Öffnung des Kanals induziert [Montell 2012].

Es zeigte sich, dass TRPC-Kanäle von Säugern, die eine enge Verwandtschaft zu dem *Drosophila* TRP-Kanal besitzen, ebenfalls alle durch den PLC-Signalweg reguliert werden [Rohacs 2013]. Inwiefern die eigentliche Regulation der einzelnen TRPC-Kanäle nach Aktivierung der PLC genau vonstatten geht, ist teilweise noch nicht abschließend geklärt und wird kontrovers diskutiert [Rohacs 2013].

Auch TRPV1 (der erste nicht „klassische“ (also nicht TRPC-Kanal) TRP-Kanal von Säugern, der kloniert werden konnte) unterliegt einer starken Regulation durch GPCR. Viele entzündungsfördernde Mediatoren induzieren nach Aktivierung der entsprechenden GPCR eine Sensitivierung des TRPV1-Kanals. Dabei vermitteln die meisten dieser GPCR ihre Effekte über den PLC-Signalweg unter Beteiligung der PKC [Mizumura et al. 2009, Rohacs 2013].

Viele TRP-Kanäle unterliegen des Weiteren einer äußerst komplexen Regulation. Als Beispiel ist an dieser Stelle TRPM8 zu nennen. Die Aktivität des Kanals wird durch  $\alpha_2$ -Adrenorezeptoren ( $G_{\alpha_i}/G_{\alpha_o}$ -gekoppelt) inhibiert.  $\alpha_2$ -Adrenorezeptoren hemmen dabei die Aktivität der Adenylatcyclase und senken somit den intrazellulären cAMP-Spiegel. Dies führt zu einer verminderten PKA-Aktivität und letztendlich zu einer Inhibition von TRPM8. Die Stimulation von  $\beta$ -Adrenorezeptoren ( $G_s$ -gekoppelt) kann diesem Effekt entgegenwirken.  $\beta$ -Adrenorezeptoren aktivieren die Adenylatcyclase und induzieren eine gesteigerte PKA-Aktivität [Bavencoffe et al. 2010]. Eine Stimulation von  $G_{\alpha_q}$ -gekoppelten Bradykinin- und Histamin-Rezeptoren führt ebenfalls zu einer Inhibition der TRPM8-Kanäle. Die Hemmung wird dabei jedoch nicht über einen klassischen Signalweg vermittelt, sondern durch eine direkte Interaktion der aktivierten  $G_{\alpha_q}$ -Untereinheit mit dem Kanal [Zhang et al. 2012].  $G_{\alpha_q}$ -gekoppelte muscarinische M3-Rezeptoren scheinen hingegen durch Stimulation der cPLA<sub>2</sub> und einer resultierenden Synthese von Arachidonsäure TRPM8 zu hemmen [Bavencoffe et al. 2011]. Die Aktivität der TRPM8-Kanäle ist des Weiteren stark abhängig von PIP<sub>2</sub>. Eine Depletion von PIP<sub>2</sub> durch  $G_{\alpha_q}$ -gekoppelte GPCR sollte somit eine Inhibition von TRPM8 induzieren [Rohacs & Nilius 2007; Bavencoffe et al. 2011]. Physiologisch relevanter ist jedoch in diesem Zusammenhang wahrscheinlich die direkte Inhibition durch  $G_{\alpha_q}$ -Untereinheiten und weniger eine PIP<sub>2</sub>-Depletion. Es konnte gezeigt werden, dass TRPM8 sogar stärker durch aktivierte  $G_{\alpha_q}$ -Untereinheiten inhibiert wird, wenn die PIP<sub>2</sub>-Konzentration künstlich in der Plasmamembran erhöht wurde [Zhang et al. 2012].

TRPM7 zeigt ebenfalls eine durch  $G\alpha_i$ -gekoppelte Signalwege vermittelte Inhibition und eine  $G\alpha_s$ -bedingte Stimulierung (PKA abhängig) [Takezawa et al. 2004].

Auch TRPM1, der dem TRPM3 nächste verwandte Ionenkanal, ist ein prominentes Beispiel für einen TRP-Kanal, der durch einen GPCR reguliert wird. TRPM1 wird dabei in ON-Bipolarzellen der Retina durch den  $G\alpha_o$ -gekoppelten mGluR6 (nach Aktivierung von mGluR6 durch Glutamat) inhibiert [Koike et al. 2010]. Die Inhibition wird dabei, wie bereits erwähnt, durch  $\beta\gamma$ -Untereinheiten vermittelt [Shen et al. 2012].

Die hier aufgeführten Beispiele verdeutlichen, dass GPCR in der Lage sind, über eine Vielzahl von Signalwegen die Aktivität von TRP-Kanälen zu beeinflussen. Ob TRPM3 ebenfalls durch GPCR bzw. deren Signalwege moduliert wird, ist bisher nicht bekannt.



## **2. Fragestellung**

Das Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war es, die physiologische Regulation von TRPM3, besonders im Kontext der pankreatischen  $\beta$ -Zellen, zu untersuchen. Dabei lag die mögliche Modulation durch GPCR im Focus der Arbeit. Wie bereits beschrieben, werden funktionelle TRPM3-Kanäle in  $\beta$ -Zellen exprimiert und es konnte nachgewiesen werden, dass eine pharmakologische Aktivierung durch das Neurosteroid Pregnenolonsulfat die durch Glucose induzierte Insulinfreisetzung deutlich verstärken kann. Die genaue Funktion von TRPM3 in  $\beta$ -Zellen ist jedoch bis heute nur äußerst schlecht verstanden.

Die meisten an der Insulinfreisetzung beteiligten Kanäle und Mechanismen unterliegen einer strengen Regulation und Modulation. Diese Regulation wird dabei über eine Vielzahl von Faktoren (beispielsweise Hormone bzw. Neurotransmitter) vermittelt und führt letztendlich zu einer den physiologischen Gegebenheiten perfekt angepassten Freisetzung von Insulin. Sollte TRPM3 eine physiologische Rolle bei der Insulinfreisetzung spielen, so wäre zu erwarten, dass die TRPM3-Aktivität durch Modulation den physiologischen Bedingungen angepasst werden könnte. Da bereits für viele TRP-Kanäle eine Regulation durch GPCR beschrieben wurde (auch Mitglieder der TRPM-Familie) und diese Rezeptoren einen gravierenden Einfluss auf die Funktion der  $\beta$ -Zellen ausüben, lag es nahe, deren Einfluss auf die TRPM3-Aktivität zu untersuchen.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Zellkultur

In der vorliegenden Arbeit wurden Ins1 Zellen [Asfari et al. 1992], HEK293 Zellen [Graham et al. 1977] und HEK293 Zellen, die entweder Myc-TRPM3-EYFP (HEK-M3-EYFP Zellen) oder Myc-TRPM3 (HEK-M3 Zellen) stabil exprimieren, verwendet. Bei Myc-TRPM3-EYFP handelt es sich um ein Fusionsprotein aus der TRPM3 $\alpha$ 2-Variante, einem Myc-Tag am N-Terminus und EYFP am C-Terminus [Wagner et al. 2008]. Bei Myc-TRPM3 befindet sich nur ein Myc-Tag am N-Terminus der TRPM3 $\alpha$ 2-Variante [Frühwald et al. 2012]. Im weiteren Verlauf der Arbeit werden die Bezeichnungen HEK-M3-EYFP und HEK-M3 verwendet (laborintern wurde HEK-M3-EYFP als  $\alpha$ 2F2 und HEK-M3 als  $\alpha$ 2B7 bezeichnet). Die stabilen TRPM3-Zelllinien stellte Dr. Stefan Philipp (Experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie; Universität Homburg) zur Verfügung.

Für die Kultivierung der Ins1 Zellen wurde RPMI 1640 Medium (Invitrogen) mit 10 % Fetales Kälber Serum (FKS; Invitrogen), 1 mM Natriumpyruvat (Sigma-Aldrich), 10 mM HEPES (Sigma-Aldrich), 1 % Penicillin/Streptomycin (10000 Units/ml, 10000  $\mu$ g/ml; Invitrogen) und 50  $\mu$ M  $\beta$ -Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) verwendet. HEK293 Zellen wurden in MEM-Medium (Invitrogen) mit 10 % FKS kultiviert. Für die Kultivierung der HEK-M3 und HEK-M3-EYFP Zellen wurde MEM-Medium mit 10 % FKS und 1 % Geneticin (G418; Sigma-Aldrich) benutzt.

Alle Zelltypen wurden in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator kultiviert und zwei- bis dreimal die Woche passagiert. Hierfür wurde zunächst das alte Kulturmedium abgesaugt und - um tote Zellen zu entfernen - mit 7 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Nach Absaugen der Waschlösung wurden 3 ml 1x Trypsin-EDTA-Lösung (Sigma-Aldrich) in die Kulturflasche gegeben. Nach vollständigem Ablösen der Zellen vom Boden des Gefäßes wurde der Verdau mittels Zugabe von 7 ml des entsprechenden Kulturmediums abgestoppt. Anschließend vereinzelte man die Zellen mit Hilfe einer 10 ml Pipette durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren. Zur weiteren Kultivierung wurden von der erhaltenen Zellsuspension 1-3 ml (je nach Zelldichte) in eine neue Kulturflasche überführt, die bereits 13 ml des jeweiligen Kulturmediums enthielt.

Für  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging-Experimente wurden 3-4 Tropfen der Zellsuspension in vorbereitete 35 mm Kulturschälchen getropft, die ein mit Poly-L-Lysin beschichtetes Deckgläschen enthielten. Die Deckgläschen wurden stets kurz vor Passagieren der Zellen für 30 Minuten mit einer 0,1 % Poly-L-Lysin-Lösung (in  $\text{H}_2\text{O}$ ; Sigma Aldrich) beschichtet. Danach wurde die Lösung abgesaugt und das Deckgläschen zweimal mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen. Anschließend wurde noch einmal mit 1,5 ml des entsprechenden Mediums gewaschen, bevor 2 ml des entsprechenden Kulturmediums in die Schälchen vorgelegt wurden.

Für Patch-Clamp Experimente wurde ein Tropfen der Zellsuspension in ein Kulturschälchen ohne Deckgläschen gegeben. Auch hier waren pro Schälchen 2 ml Kulturmedium vorgelegt.

### **3.2 Transfektionen**

HEK293 Zellen und HEK-M3 Zellen wurden mit Hilfe des Transfektionsreagenz Polyfect (Qiagen) transient transfiziert. Um eine optimale Transfektionsrate zu gewährleisten, wurden die Zellen am Tag vor der eigentlichen Transfektion in 35 mm Kulturschälchen so ausgesät, dass die Dichte der Zellen am Tag der Transfektion 80-90 % betrug. Kurz vor der Transfektion wurde das alte Kulturmedium abgenommen und 1,5 ml frisches hinzugegeben.

Für die eigentliche Transfektion wurden 100  $\mu\text{l}$  OptiMEM (Invitrogen), 3  $\mu\text{g}$  der entsprechenden cDNA und 9  $\mu\text{l}$  des Transfektionsreagenz Polyfect in ein Reaktionsgefäß gegeben, gründlich gemischt und für mindestens 10 min inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit 0,6 ml Kulturmedium gemischt und dann vollständig und vorsichtig auf die vorbereiteten Kulturschalen getropft. Die transfizierten Zellen wurden nach 24 h neu passagiert und auf 2 bis 8 Kulturschälchen aufgeteilt. Am nächsten Tag konnten die Zellen gemessen werden.

Ins1 Zellen wurden mit Hilfe des Transfektionsreagenz Lipofectamin 2000 (Invitrogen) transient transfiziert. Die Zellen wurden entsprechend der Polyfect-Transfektion vorbereitet. In ein Reaktionsgefäß wurden 250  $\mu\text{l}$  OptiMEM und 2  $\mu\text{g}$  der entsprechenden cDNA gegeben und vorsichtig gemischt. In ein zweites Reaktionsgefäß wurden 10  $\mu\text{l}$  Lipofectamin 2000 und 250  $\mu\text{l}$  OptiMEM gegeben und ebenfalls vorsichtig gemischt. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden die beiden Reaktionsansätze

zusammengeführt und für weitere 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde dem Reaktionsgemisch 300 µl des Ins1-Mediums hinzugefügt und der gesamte Transfektionsansatz vorsichtig auf die vorbereiteten Kulturschälchen geträufelt. Die transfizierten Zellen wurden ebenfalls nach 24 h neu passagiert und auf 2 bis 8 Kulturschälchen aufgeteilt. Gemessen wurden die transfizierten Zellen ca. 24-48 h nach dem Passagieren.

Für die TIRF-Messungen wurden die Zellen direkt in spezielle Kulturschälchen mit Glasboden (50/40 mm, Glasdicke 0,17 mm; Willco Wells) transfiziert und nach der Transfektion nicht erneut gesplittet. Ansonsten wurde wie oben beschrieben verfahren.

### Auflistung der durchgeführten Transfektionen

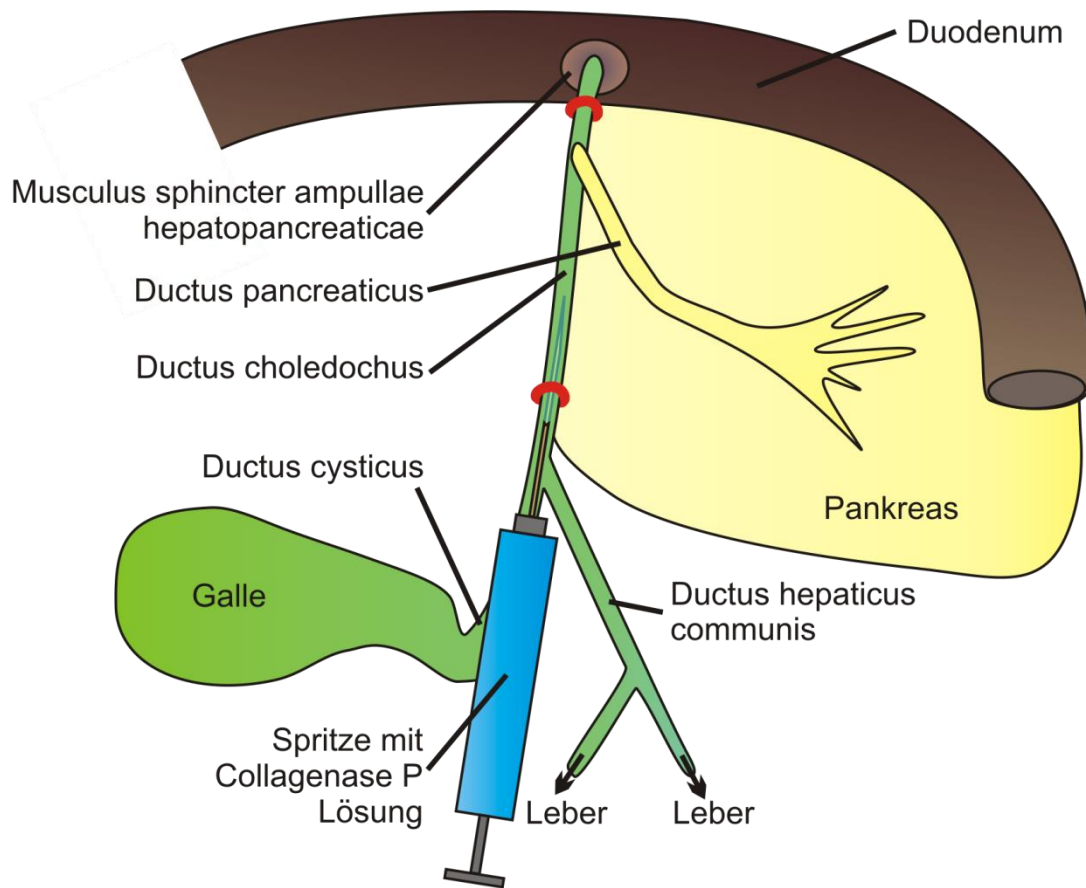
Abb.	Transfektion: Experiment	Transfektion: Kontrolle
7 A	$\alpha_{2A}$ -Adrenorezeptor + pCAGGSL1	untransfiziert
7 B	$\alpha_{2B}$ -Adrenorezeptor + pCAGGSL1	untransfiziert
7 C	$\alpha_{2C}$ -Adrenorezeptor + pCAGGSL1	untransfiziert
7 D	$\alpha_{2A}$ -Adrenorezeptor-YFP	-
9 C	$\alpha_{2A}$ -Adrenorezeptor + pCAGGSL1	-
10	mGluR6	-
16	$\alpha_{2A}$ -Adrenorezeptor + pCAGGSL1	-
17 A, G	G $\alpha_{i1WT}$ + pcDNA3-IRESGFP	pcDNA3 + pcDNA3-IRESGFP
17 B, H	G $\alpha_{i1QtoL}$ + pcDNA3-IRESGFP	pcDNA3 + pcDNA3-IRESGFP
17 D, J	G $\alpha_{o1WT}$ + pcDNA3-IRESGFP	pcDNA3 + pcDNA3-IRESGFP
17 E, K	G $\alpha_{o1QtoL}$ + pcDNA3-IRESGFP	pcDNA3 + pcDNA3-IRESGFP
18 A	$\beta_1$ (in pcMV) + $\gamma_1$ + pCAGGSL1	pcDNA3 + pCAGGSL1
18 B	$\beta_1$ (in pMT2) + $\gamma_2$ + pCAGGSL1 / $\beta_1$ (in pcMV) + $\gamma_2$ + pcDNA3-IRESGFP	pcDNA3 + pCAGGSL1 / pcDNA3 + pcDNA3-IRESGFP
18 C	$\beta_1$ (in pcMV) + $\gamma_3$ + pCAGGSL1	pcDNA3 + pCAGGSL1
18 D	$\beta_1$ (in pcMV) + $\gamma_4$ + pCAGGSL1	pcDNA3 + pCAGGSL1
18 E	$\beta_1$ (in pcMV) + $\gamma_5$ + pCAGGSL1	pcDNA3 + pCAGGSL1
18 F	$\beta_1$ (in pcMV) + $\gamma_7$ + pCAGGSL1	pcDNA3 + pCAGGSL1
18 G	$\beta_1$ (in pcMV) + $\gamma_{13}$ + pCAGGSL1	pcDNA3 + pCAGGSL1
19 A	$\beta_2$ + $\gamma_2$ + pCAGGSL1	pcDNA3 + pCAGGSL1
19 B	$\beta_3$ + $\gamma_2$ + pcDNA3-IRESGFP	pcDNA3 + pcDNA3-IRESGFP
19 C	$\beta_4$ + $\gamma_2$ + pCAGGSL1	pcDNA3 + pCAGGSL1
19 D	$\beta_{5S}$ + RGS7 + pCAGGSL1	pcDNA3 + pCAGGSL1
19 E	$\beta_{5I}$ + RGS7 + pCAGGSL1	pcDNA3 + pCAGGSL1
19 F	$\beta_1$ (in pcMV) + pcDNA3 + pCAGGSL1	pcDNA3 + pCAGGSL1
19 G	$\beta_2$ + pcDNA3 + pCAGGSL1	pcDNA3 + pCAGGSL1
19 H	$\beta_3$ + pcDNA3 + pcDNA3-IRESGFP	pcDNA3 + pcDNA3-IRESGFP
19 I	$\gamma_2$ + pcDNA3 + pCAGGSL1	pcDNA3 + pCAGGSL1
20	$\beta_1$ (in pMT2) + $\gamma_2$ + pCAGGSL1	pcDNA3 + pCAGGSL1
21	$\beta_1$ (in pMT2) + $\gamma_2$ + pCAGGSL1	pcDNA3 + pCAGGSL1
22 A	myr- $\beta$ -ARKct	untransfiziert
22 C	myr-Phosducin	untransfiziert
22 E	myr- $\beta$ -ARKct + $\alpha_{2A}$ -Adrenorezeptor	$\alpha_{2A}$ -Adrenorezeptor + pCAGGSL1
22 G	myr- $\beta$ -ARKct + mGluR6	mGluR6 + pCAGGSL1

23	$\beta_1$ (in pMT2) + $\gamma_2$ + myr- $\beta$ -ARKct	$\beta_1$ (in pcMV) + $\gamma_2$ + pCAGGSL1
25 A	PLC $\delta$ 1-PH	-
25 B	PKC $\gamma$ C1	-
25 C	M1-Rezeptor + $\alpha_{2A}$ -Adrenorezeptor + PKC $\gamma$ C1	-
26 A, D	$\alpha_{2A}$ -Adrenorezeptor + pCAGGSL1	-
27 B	$\alpha_{2A}$ -Adrenorezeptor + pCAGGSL1	-
30 A	$\alpha_{2A}$ -Adrenorezeptor + TRPM3 $\alpha$ 2	-
30 B	$\alpha_{2A}$ -Adrenorezeptor + TRPM3 $\alpha$ 3	-
30 C	$\alpha_{2A}$ -Adrenorezeptor + TRPM3 $\alpha$ 4	-
30 D	$\alpha_{2A}$ -Adrenorezeptor + TRPM3 $\alpha$ 5	-
30 E	$\alpha_{2A}$ -Adrenorezeptor + TRPM3 $\alpha$ 6	-
31 A	TRPM3 $\alpha$ 2 + $\beta_1$ (in pcMV) + $\gamma_2$	TRPM3 $\alpha$ 2 + pcDNA3
31 B	TRPM3 $\alpha$ 3 + $\beta_1$ (in pcMV) + $\gamma_2$	TRPM3 $\alpha$ 3 + pcDNA3
31 C	TRPM3 $\alpha$ 4 + $\beta_1$ (in pcMV) + $\gamma_2$	TRPM3 $\alpha$ 4 + pcDNA3
31 D	TRPM3 $\alpha$ 5 + $\beta_1$ (in pcMV) + $\gamma_2$	TRPM3 $\alpha$ 5 + pcDNA3
31 E	TRPM3 $\alpha$ 6 + $\beta_1$ (in pcMV) + $\gamma_2$	TRPM3 $\alpha$ 6 + pcDNA3
32	TRPM1 $\Delta$ Ex11 + $\beta_1$ (in pcMV) + $\gamma_2$	TRPM1 $\Delta$ Ex11 + pCAGGSL1

**Tabelle 3-1:** Auflistung der durchgeführten Transfektionen bei den entsprechenden Abbildungen. Weitere Informationen zu den Konstrukten und Kontrollvektoren sind in Kapitel „3.6 Molekularbiologie“ zu finden.

### 3.3 Präparation pankreatischer $\beta$ -Zellen der Maus

Für die Präparation der  $\beta$ -Zellen wurden ausschließlich BL6/C57 Mäuse verwendet. Für die Experimente wurden sowohl männliche, als auch weibliche Mäuse verwendet. Das Alter der Mäuse lag zwischen 10 Wochen und über einem Jahr. Die Mäuse wurden durch Genickbruch getötet, anschließend dekapitiert und auf einer Platte fixiert. Unter einem Binokular wurde die Bauchhöhle eröffnet und durch vorsichtiges Verschieben von Leber und Darmtrakt das Pankreas gut zugänglich freigelegt. Anschließend wurde der Ductus choledochus (der Hauptgallengang) dicht am Musculus sphincter ampullae hepatopancreaticae (Schließmuskel am Übergang des Hauptgallengangs und des Bauchspeicheldrüsendgangs in den Zwölffingerdarm) mit Hilfe eines Fadens abgebunden. Ein weiterer Faden wurde in Form einer Schleife um den unteren Teil des Ductus choledochus gelegt, jedoch noch nicht festgezogen. Anschließend wurde zwischen der gelegten Schleife und der Gabelung des Ductus cysticus und des Ductus hepaticus communis der Hauptgallengang bis zur Hälfte eingeschnitten. Durch diesen Schnitt wurde eine feine und flexible Spitze (Microfillament 34 Gauge/67 mm; World Precision Instruments, Inc.) einer mit kalter Collagenase P Lösung (1,7 mg/ml (Roche) in HBSS (Invitrogen) mit 0,5 % BSA (Sigma-Aldrich)) gefüllten Spritze, in den Ductus choledochus in Richtung des Duodenums (Zwölffingerdarm) eingeführt und durch Festziehen des Fadens fixiert (siehe Abb. 3-1). Danach wurden 2 ml der



**Abbildung 3-1: Schematische Darstellung der Pankreaspräparation zur Gewinnung der  $\beta$ -Zellen.** In Rot sind die Ligationen gezeigt, die sicherstellten, dass die eingespritzte Collagenaselösung nur in das Pankreas strömen konnte. Teile der Abbildungen wurden von MacDonald & Rorsman (2006) entnommen.

Collagenaselösung injiziert, wobei die beiden Ligationen sicherstellten, dass die Lösung nur in das Pankreas fließen konnte. Durch Einspritzen der großen Flüssigkeitsmenge bläht sich das Pankreas auf und konnte von Magen, Darm und der Milz freipräpariert werden. Das so freigelegte Pankreas wurde danach als Ganzes in ein 15 ml Gefäß überführt und in einem Wasserbad bei 37 °C für 10 – 11 min unter ständiger Bewegung verdaut. Durch Zugabe von 10 ml eiskaltem HBSS / 0,5 % BSA wurde der Verdauungsprozess anschließend beendet. Nach vorsichtigem Titrieren mit einer 10 ml serologischen Pipette wurde die Zellsuspension bei 300 g (Hermle Z300) abzentrifugiert und der gesamte Überstand verworfen. Das verbleibende Pellet wurde in 10 ml HBSS / 0,5 % BSA resuspendiert und die Zelllösung auf zwei mit HBSS / 0,5 % BSA gefüllten Petrischalen verteilt. Die Unterseite der Petrischalen wurden zuvor von außen geschwärzt, um die weißlichen Langerhans-Inseln besser identifizieren zu können. Die Dauer des Verdaus wurde so gewählt, dass das exokrine Pankreasgewebe

bereits weitgehend aufgelöst wurde, die kompakter organisierten Langerhans-Inseln jedoch unversehrt blieben. Mit Hilfe einer 200 µl Pipette wurden die Inseln eingesammelt und in eine weitere HBSS / 0,5 % BSA gefüllte Petrischale überführt. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt, bis das exokrine Gewebe vollständig entfernt wurde. Nachfolgend wurden die Inseln in 9 ml divalentfreies DPBS (Sigma-Aldrich) überführt und erneut bei 300 g für 30 s abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Inseln in 10 ml divalentfreies DPBS, das 1 % 10x Trypsin-EGTA-Lösung enthielt, überführt und für 2 min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Inseln bei 300 g für 1 min abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und 6 ml Ins1 Medium hinzugegeben. Danach wurde mit einer abgeflamten Pasteurpipette 10- bis 15-mal titriert, bis nahezu keine Inseln in der Lösung erkennbar waren. Danach wurden die vereinzelter Inselzellen für 2 min bei 400 g abzentrifugiert und der Überstand fast vollständig abgenommen und verworfen. Das Zellpellet wurde im verbleibenden Kulturmedium resuspendiert und jeweils ca. 50 µl Zellsuspension wurden auf vorbereitete, Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen pipettiert, wobei sich auf jedem Deckgläschen letztlich etwa die Zellmenge von 20 Langerhans-Inseln befand. Danach wurden die Kulturschälchen für 30-60 min im Brutschrank inkubiert, um ein Anhaften der Zellen zu gewährleisten. Im letzten Schritt wurden die Schälchen vorsichtig mit je 2 ml Ins1 Medium gefüllt und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag konnten die Zellen experimentell genutzt werden.

### **3.4 Fluoreszenzmessungen**

#### **Ca<sup>2+</sup>-Imaging mit Fura-2**

Da es sich bei TRPM3 um einen Ca<sup>2+</sup>-permeablen Kationenkanal handelt, konnte dessen Aktivität in der Plasmamembran indirekt durch Messen der cytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration bzw. deren Änderung bestimmt werden. Zur Bestimmung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration wurde der Ca<sup>2+</sup>-sensitive Fluoreszenzindikator Fura-2 [Grynkiewicz et al. 1985] verwendet. Dessen Fluoreszenzintensität ist abhängig von der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration und der Wellenlänge des Anregungslichts. Als Anregungswellenlängen wurden 340 (± 13) nm und 380 (± 13) nm gewählt und die Fluoreszenzemission wurde bei 510 (± 40) nm gemessen. Bei steigender Ca<sup>2+</sup>-Konzentration sinkt

die Fluoreszenzintensität bei einer Anregung mit 380 nm, steigt jedoch hingegen bei Anregung mit 340 nm. Die Fluoreszenz bei den jeweiligen Wellenlängen ist allerdings nicht nur abhängig von der vorhandenen  $\text{Ca}^{2+}$  Menge, sondern auch von der Farbstoffkonzentration, der Dicke der gemessenen Zelle und den optischen Eigenschaften der Messapparatur. Diese Faktoren sind jedoch für beide Anregungswellenlängen identisch. Bestimmt man nun kurz hintereinander die Fluoreszenzintensität bei beiden Wellenlängen und bildet den Quotienten der erhaltenen Intensitäten (ratio (340/380)), erhält man einen Wert, der nur von der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration abhängig ist und so den qualitativen Vergleich verschiedener Zellen ermöglicht.

### **Aufbau und Steuerung des Messstandes**

Kernstück der Messapparatur war ein inverses Mikroskop (Eclipse TE 2000, Nikon), das sich auf einem schwingungsgedämpften Tisch befand. Eine Quecksilberdampfampe (120 Watt UVICO, Rapp OptoElectronic oder 100 Watt, Nikon) wurde als Lichtquelle verwendet. Zur Erzeugung der benötigten Wellenlängen wurde das Licht der Lampe durch einen Filter für entweder 340 nm (D340/13, AHF Analysentechnik) oder 380 nm (D380/13, AHF Analysentechnik) gelenkt. Beide Filter befanden sich in einem Filterrad (Ludl) und konnten so abwechselnd in den Strahlengang eingebracht werden. Mit einem am Filterrad angebrachten Shutter (Schließmechanismus) wurde die Belichtungszeit reguliert. Nachdem das Licht den jeweiligen Filter passierte, traf es auf einen Filterblock, in dem sich ein dichroischer Spiegel befand (400 DCLP, AHF Analysentechnik). Dieser lenkte nun das kurzwellige Anregungslicht durch das Objektiv (10x SFluor N.A. 0.5, Nikon) auf die in der Messkammer befindlichen Zellen. Das längerwellige Emissionslicht gelangte durch das Objektiv zurück zum dichroischen Spiegel und passierte diesen. Bevor das Emissionslicht von einer CCR-Kamera (Retiga Exi, QImaging) detektiert wurde, musste es noch einen Emissionsfilter (D510/40, AHF Analysentechnik) passieren.

Während der Messungen wurden wiederholt in einem Zeitintervall von 5 s je ein Bild bei 340 nm und 380 nm Anregungswellenlänge mit einer Belichtungszeit von 150 ms aufgenommen, wobei zwischen den beiden Aufnahmen 800 ms lagen. Filterrad, Shutter und Kamera wurden dabei über ein Triggerinterface (TIB 14S; HEKA) mittels



der Software Patchmaster (HEKA) angesteuert. Dabei wurde 300 ms vor einer Aufnahme der entsprechende Filter bereits in den Strahlengang gedreht. Der Shutter wurde 90 ms vor Aktivierung der Kamera geöffnet und 40 ms nach der Belichtung geschlossen. Dies gewährleistete einerseits eine fehlerfreie Aufnahme der Fluoreszenzbilder und andererseits verringerte die kurze Öffnung des Shutters ein Bleichen des Fluoreszenzfarbstoffs. Die Belichtungszeit der Kamera wurde über die Software QCapture 5 (QImaging) eingestellt.

In der überwiegenden Anzahl der Experimente befanden sich die zu messenden Zellen in einer geschlossenen Messkammer (RC-21BR, Warner Instruments). In diese konnten mit Hilfe eines selbstangefertigten, gravitationsbetriebenen Perfussionssystems durch eine Öffnung Lösungen eingeleitet werden. Mehrere Lösungsreservoirs liefen über Schläuche in eine gemeinsame Applikationsspitze zusammen, so dass während der Messungen verschiedene Lösungen in die Kammer geleitet werden konnten. Überschüssige, aus der Messkammer austretende Lösung wurde abgesaugt. Die Lösungen konnten automatisch mit einer Ventilbank (ALA-VM8, ALA Scientific Instruments), ebenfalls angesteuert durch die Patchmaster Software, appliziert werden.

Die Experimente mit dem  $\beta\gamma$ -Bindepeptid mSIRK bzw. mSIRK<sub>L9A</sub> wurden aufgrund der geringen Verfügbarkeit der Peptide in einer offenen Kammer durchgeführt. Die applizierten Substanzen wurden während der Messung in die Kammer pipettiert. Diese Methode erlaubte es, mit deutlich kleineren Lösungsvolumina zu arbeiten, als sie für Experimente in einem geschlossenen System benötigt werden.

### **Beladen der Zellen mit Fura-2/AM**

Die Zellen wurden mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluoreszenzindikator Fura-2/AM (Biotium) beladen. Bei diesem Fura-2-Derivat sind die lipophoben Carboxylgruppen des Fura-2 mit Acetoxymethylgruppen verestert. Durch diese Modifikation erhält der Fluoreszenzfarbstoff lipophile Eigenschaften, ist membrangängig und kann so in die Zellen diffundieren. Im Cytosol der Zellen werden die Estergruppen dann durch endogene, unspezifische Esterasen abgespalten, so dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Carboxylgruppen wieder freigegeben werden. Die Konzentration der Fura-2/AM Stocklösung betrug 1 mM und wurde mit Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma-Aldrich)

angesetzt. Für die Beladung der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff wurden diese mit 5  $\mu$ M Fura-2/AM im jeweiligen Kulturmedium bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss für 30 min inkubiert.

### **Durchführung der Ca<sup>2+</sup>-Imaging Experimente**

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit der entsprechenden Badlösung gewaschen und anschließend das Deckgläschen mit den Zellen in die Messkammer überführt. Die Messungen wurden, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt. Bei der überwiegenden Mehrzahl der Messungen wurde die Standardbadlösung (niedrige Glucosekonzentration) verwendet. Bei folgenden Messungen wurde die Badlösung mit 10 mM Glucose genutzt: Abb. 4-2 A-E, Abb. 4-6 A und C, Abb. 4-10 A und H, Abb. 4-11 B, Abb. 4-13 A. Die während der Messungen applizierten Substanzen wurden zunächst als Stocklösung im entsprechenden Lösungsmittel gelöst und dann der Badlösung in der jeweiligen Konzentration hinzugegeben. Die Endkonzentration der Substanzen ist den Abbildungen und dem dazugehörigen Text zu entnehmen. Eine Auflistung der verwendeten Substanzen und der verwendeten Lösungsmittel ist in Tabelle 3-4 zu finden. Glutamat wurde der Badlösung direkt zugegeben. Die jeweiligen Applikationsprotokolle sind den Abbildungen zu entnehmen. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt, mit Ausnahme des in Abbildung 12 C gezeigten Experiments, das bei 37° C durchgeführt wurde. Die Erwärmung der Lösung wurde mittels eines Durchlauferhitzers (Steuereinheit TC344B, Durchlauferhitzer SF-28; Warner Instruments) und einer beheizbaren Probenplattform (Warner Instruments), verwirklicht.

### **Analyse und Auswertung der Fluoreszenzmessungen**

Für die Auswertung der Fluoreszenzbilder wurde die Software ImageJ (Version 1.37) mit einer von Prof. Dr. Johannes Oberwinkler angepassten Version des „Ratio Plus Plugins“ verwendet. Zunächst wurde ein Bereich (ROI, Region Of Interest) ohne Zellen markiert, um die Hintergrundfluoreszenz zu erfassen. Die gemittelte Intensität dieser ROI wurde in jedem Bild errechnet und als Hintergrundfluoreszenz vom jeweiligen Bild abgezogen. Zellen wurden während der Messungen ebenfalls mittels ROIs markiert. Für die beiden durch Anregung mit 340 nm und 380 nm erhaltenen Bilder wurde

anschließend für jeden Pixel (innerhalb der ROI) der Quotient (ratio (340/380)) berechnet, und der ratio (340/380) Wert für jede ROI einzeln über deren Pixel gemittelt, über die Zeit dargestellt und gespeichert. Unterschritt eine Pixelintensität den Wert von 100 Einheiten der Kameraintensität, wurde er als NaN (Not a Number) gewertet und somit aussortiert.

Die Auswertung der Messungen erfolgte mit den Programmen Origin 7 (Origin Lab Corporation) und Excel 2003 (Microsoft). Es werden überwiegend aus mehreren Messungen gemittelte ratio (340/380) Werte, aufgetragen gegen die Zeit, gezeigt. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Die Anzahl der gemessenen Zellen ist den jeweiligen Abbildungen zu entnehmen.

### **TIRFM- (total internal reflection fluorescence microscopy) Messungen**

In der TIRF-Mikroskopie wird ein evaneszentes Feld ausgenutzt, das entsteht, wenn Licht in einem gewissen Winkel (der den sogenannten „kritischen Winkel“ überschreitet) von einem optisch dichteren auf ein optisch dünneres Medium trifft und an dieser Grenzfläche (beispielsweise Glas-Wasser-Grenzfläche) total reflektiert wird. Die Intensität dieses Feldes nimmt exponentiell zur Probe hin ab, so dass die Eindringtiefe äußerst gering ist und bei etwa 50 - 150 nm liegt. Experimentell wurde dieses Phänomen zum ersten Mal genutzt, um Zellmigration auf einer Glasoberfläche zu untersuchen [Ambrose 1956] und wurde im Jahre 1989 zur eigentlichen TIRF-Mikroskopie weiterentwickelt [Axelrod 1989]. Durch die geringe Eindringtiefe des evaneszenten Feldes werden nur Fluorophore angeregt, die sich an der Plasmamembran bzw. sehr dicht bei ihr befinden. Dies führt zu einem sehr guten Signal-Rausch-Verhältnis, bringt jedoch die Einschränkung mit sich, dass nur ein äußerst kleiner Bereich an der Grenzschicht zwischen Deckglas und Flüssigkeit betrachtet werden kann [Tsiavalariis et al. 2003].

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche Translokationssensoren während der TIRF-Messungen verwendet, zum einen PLC $\delta$ 1-PH [Balla & Várnai 2009; Halaszovich et al. 2009], eine PIP<sub>2</sub>-bindende (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat) Proteindomäne und zum anderen PKC $\gamma$ C1 [Oancea et al. 1998], eine DAG-bindende (Diacylglycerol) Proteindomäne. Beide Sensoren waren an EGFP (enhanced green fluorescent protein) gekoppelt und zeigten nach Anregung die EGFP typische Emission

bei 509 nm. Im Ruhezustand der Zelle ist die PIP<sub>2</sub>-Konzentration in der Zelle relativ hoch und konstant. Somit können viele Moleküle des PIP<sub>2</sub>-bindenden Peptids PIP<sub>2</sub> an der Plasmamembran binden, so dass eine hohe TIRF-Fluoreszenz zu detektieren ist. Wird nun ein PIP<sub>2</sub>-Abbau angeregt, sinkt die PIP<sub>2</sub>-Konzentration in der Plasmamembran und weniger PIP<sub>2</sub>-bindende Proteindomänen (PLCδ1-PH) können an der Plasmamembran binden und diffundieren in Richtung Cytosol. Als direkte Folge sinkt die TIRF-Fluoreszenz. Für die DAG-bindende Proteindomäne (PKCγC1) verhält es sich umgekehrt. Unter Ruhebedingungen liegt kaum DAG in der Plasmamembran vor, da es erst bei der Spaltung von PIP<sub>2</sub> entsteht. Dementsprechend befinden sich nur wenige PKCγC1-Peptide an der Plasmamembran und nur ein sehr schwaches TIRF-Signal ist zu detektieren. Wird nun aber die PIP<sub>2</sub>-Spaltung angeregt und somit die DAG-Bildung gefördert, können die PKCγC1-Peptide an die Plasmamembran binden und die TIRF-Fluoreszenzintensität steigt. Somit kann über die TIRF-Fluoreszenzintensität der beiden Sensoren direkt (PLCδ1-PH) oder indirekt (PKCγC1) eine Aussage über die Änderung der PIP<sub>2</sub>-Konzentration in der Plasmamembran getroffen werden.

### **Der TIRF-Messstand**

Die TIRF-Messungen wurden mit Hilfe eines aufrechten Mikroskops (BX51WI, Olympus), ausgerüstet mit einem TIRF-Kondensor (1,45 numerische Apertur, Olympus) und einem Laser (488 nm, 20 mW, Picarro) durchgeführt. Die Messapparatur befand sich auf einem schwingungsgedämpften Tisch, um störungsfreie Messungen zu gewährleisten. Während der Messungen wurde ein Wasserimmersionsobjektiv (LUMPlanFI / IR 40x / 0.8 numerische Apertur) verwendet und die Bilder wurden mit einer gekühlten CCD Kamera (IMAGO-QE, TILL Photonics GmbH) aufgenommen. Für Epifluoreszenzaufnahmen wurde ein Monochromator (Polychrome IV, TILL Photonics GmbH) eingesetzt. Über die Software TillvisiON (TILL Photonics GmbH) wurden der Lasershutter, der Monochromator und die Bildaufnahme gesteuert.

### **Durchführung der TIRF-Experimente**

Mit Hilfe der Epifluoreszenz wurden zunächst die transfizierten Zellen lokalisiert. Dabei wurde ein Ausschnitt bevorzugt, indem sich mehrere Zellen befanden, die das entsprechende Konstrukt (PLCδ1-PH oder PKCγC1) exprimierten. Nachdem eine geeignete Stelle ausgesucht war, wurde ein gravitationsbetriebenes Perfusionssystem

so vor den zu messenden Zellen platziert, dass eine schnelle und genau Applikation gewährleistet wurde. Der Kondensor wurde so eingestellt, dass die gewünschte totale interne Reflektion erreicht wurde. Während einer Messung wurde alle 3 s ein Bild aufgenommen. Das Applikationsprotokoll ist der entsprechenden Abbildung zu entnehmen. Die Messungen wurden bei RT durchgeführt unter Verwendung der Standardbadlösung.

### **Analyse und Auswertung der TIRF-Experimente**

Die Analyse der Messungen wurde mit Tillvislon und Origin 7 durchgeführt. Als ROI wurden Bereiche mit deutlichem TIRF-Signal, also Areale, in denen die Zellen direkten Kontakt mit dem Glasboden hatten, ausgewählt. Die  $F/F_0$ -Werte ergaben sich aus der Fluoreszenzintensität des TIRF-Signals ( $F$ ), gemittelt über die ROIs und geteilt durch die Ausgangsfluoreszenz ( $F_0$ ). Für  $F_0$  wurden die Fluoreszenzintensitäten der ersten 19 Bilder gemittelt. Von den erhaltenen Werten wurde außerdem noch die Hintergrundfluoreszenz abgezogen, die in einem zellfreien Bereich gemessen wurde.

## **3.5 Elektrophysiologie**

### **Patch-Clamp Technik**

Die Patch-Clamp Technik, mit der sich Ionenströme durch Ionenkanäle in der Plasmamembran messen lassen, gehört heutzutage zu den Standardmessverfahren der Elektrophysiologie und wurde von Erwin Neher und Bert Sakmann entwickelt und 1976 zum ersten Mal beschrieben [Neher & Sakmann 1976]. Ursprünglich gedacht um Einzelkanalströme messen zu können, wurde durch Weiterentwicklung und Verbesserung der Technik [Hamill et al. 1981] ein breites Spektrum von Anwendungsmöglichkeiten erschlossen. Die wichtigsten Messkonfigurationen sind dabei die Cell-Attached-, Whole-Cell-, Inside-Out- und Outside-Out-Konfiguration. Grundlage all dieser Messvariationen ist die Bildung des sogenannten Giga-Seals. Dabei handelt es sich um einen sehr hohen Abdichtwiderstand von bis zu mehreren Gigaohm zwischen der Patchpipette, deren Spitze eine nur wenige  $\mu\text{m}$  große Öffnung besitzt, und der Plasmamembran der Zelle. Um diese zu erreichen, wird zunächst eine Patchpipette der Zellmembran aufgesetzt und ein leichter Unterdruck angelegt. Dadurch stülpt sich die Membran der Zelle leicht in die Öffnung der Pipette und es

entsteht ein enger Kontakt zwischen Glas und Lipidschicht. Der so entstandene Abdichtwiderstand sorgt für eine elektrische Isolierung des Membranstücks innerhalb der Pipettenöffnung. Ist auf diese Art und Weise ein Giga-Seal gebildet worden, spricht man von der Cell-Attached-Konfiguration. Diese Konfiguration wurde während der Experimente bezüglich des membranbegrenzten Noradrenalin-Effektes (siehe Kapitel 4.7) verwendet. Ausgehend von der Cell-Attached-Konfiguration kann durch Herausziehen des Membranpatches aus der Zelle die Inside-Out-Konfiguration erreicht werden. Dabei befindet sich nun die cytoplasmatische Membranseite der Badlösung zugewandt. Diese Messmethode wurde in abgewandelter Form, dem Giant-Excised-Patch, verwendet (siehe Kapitel 4.14).

Bei der überwiegenden Mehrzahl der elektrophysiologischen Messungen wurde die Whole-Cell-Konfiguration verwendet. Diese erlangt man, wenn man ausgehend von der Cell-Attached-Konfiguration einen kurzen starken Unterdruck an die Patchpipette anlegt, so dass die Zellmembran unter der Pipette aufreißt und man elektrischen Zugang zur gesamten Zelle erhält. Man misst folglich die Summe aller aktiven Ionenkanäle in der Zelle und erhält deutlich größere Ströme. Weiterhin kommt es zu einem Austausch des Inneren der Zelle und der Pipettenlösung (innerhalb von einer bis mehreren Minuten) [Pusch & Neher 1988]. Dies ermöglicht, die intrazelluläre Ionenkonzentration in der Zelle beliebig zu manipulieren [Numberger & Draguhn 1996].

Die Outside-Out-Konfiguration wurde in der vorliegenden Arbeit nicht verwendet und wird deshalb auch nicht näher beschrieben.

### **Der Messstand**

Alle elektrophysiologischen Experimente, mit Ausnahme der Giant-Patch Messungen, wurden am selben Setup durchgeführt. Ein inverses Mikroskop (Eclipse TE 2000, Nikon) befand sich auf einem schwingungsisolierten Tisch und die gesamte Messapparatur wurde von einem Faraday-Käfig umgeben, um elektrische Störsignale abzuschirmen. Der Vorverstärker samt Elektrodenhalter war an einem motorisierten Mikromanipulator (Scientifica) montiert und mit dem Hauptverstärker verbunden (EPC10, HEKA). Dieser wurde durch einen Computer unter Verwendung der Patchmaster Software (HEKA) angesteuert. Für die Mess- und Referenzelektrode wurde chloridierter Silberdraht verwendet. In der Mitte des Objektisches befand sich

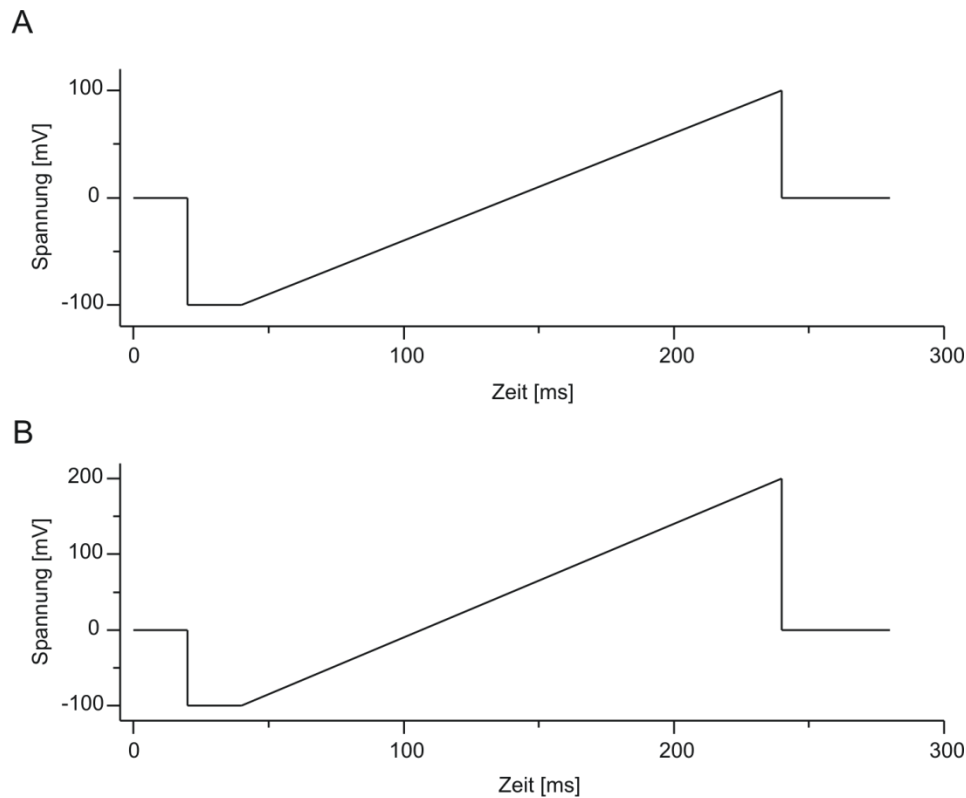
eine speziell angefertigte Halterung, in die Kulturschälchen mit den zu messenden Zellen eingesetzt werden konnten. Für die Applikation von Lösungen wurde ein selbstangefertigtes gravitationsbetriebenes Perfusionssystem verwendet. Dieses bestand aus mehreren Lösungsreservoirs, die über Schläuche mit einer feinen Applikationsspitze (Innendurchmesser: 250  $\mu\text{m}$ ) verbunden waren. Die Verwendung von mehreren Schläuchen ermöglichte die Applikation von verschiedenen Lösungen während der Messungen. Die Öffnung der Spitze wurde während der Messungen in einem Abstand von etwa 200  $\mu\text{m}$  vor der zu messenden Zelle platziert, so dass eine schnelle Applikation (unter 1 s) der entsprechenden Lösungen gewährleistet wurde. Mit Hilfe einer Ventilbank (ALA-VM8, ALA Scientific Instruments), die ebenfalls durch die Patchmaster Software angesteuert wurde, konnten die einzelnen Lösungen gezielt und unabhängig voneinander appliziert werden.

### **Whole-Cell Messungen**

Alle Whole-Cell Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Bei der überwiegenden Mehrzahl der Messungen wurde die Standardbadlösung (niedrige Glucosekonzentration) verwendet. Bei folgenden Messungen wurde die Badlösung mit 10 mM Glucose genutzt: Abb. 4-1 A-I, Abb. 4-10 C-G. Während der Messungen wurden ausschließlich Spannungsrampen von -100 mV bis +100 mV appliziert, bei einem Haltepotential von 0 mV. Die hier angegebenen Spannungswerte sind nicht für das „liquid junction potential“ (LJP) korrigiert. Der genaue Aufbau der Spannungsrampen ist Abbildung 3-2 zu entnehmen. Die Frequenz der applizierten Rampen lag bei 1 Hz. Vor jeder Spannungsrampe wurde die Zellkapazität und der Serienwiderstand („Cslow“) automatisch abgeglichen und bei allen Messungen wurde der Serienwiderstand zu 80 % kompensiert.

### **Cell-Attached Messungen**

Die Cell-Attached Konfiguration wurde lediglich für die Experimente bezüglich des membranbegrenzten Noradrenalin-Effekts verwendet. Die Messungen wurden bei Raumtemperatur unter Verwendung der Standardbadlösung durchgeführt. Während der Messungen wurden Spannungsrampen von -100 mV bis +200 mV appliziert, bei einem Haltepotential von 0 mV. Dabei ist zu beachten, dass die angelegte Spannung nicht dem eigentlichen absoluten Membranpotential entspricht. Dieses ergibt sich aus



**Abbildung 3-2: Graphische Darstellungen der applizierten Spannungsrampen.** (A) Bei Whole-Cell bzw. Giant Excised Patch Messungen und (B) bei Experimenten in der Cell-Attached Konfiguration. Die hier angegebenen Spannungswerte sind nicht für das „liquid junction potential“ (LJP) korrigiert.

der Summe der angelegten Spannung und dem Membranpotential der gemessenen Zelle. Da das Membranpotential der Zelle nicht bekannt ist, liegt die eigentliche Spannung während der Messungen deutlich unter der applizierten Spannung. Um dies auszugleichen und um stärkere Auswärtsströme zu forcieren, wurde die hohe positive Spannung von +200 mV gewählt. Das detaillierte Design der Spannungsrampen ist Abbildung 3-2 zu entnehmen. Die Rampenfrequenz lag bei 1 Hz und vor jeder Spannungsrampe wurde die Kapazität des Membranpatches („Cfast“) automatisch kompensiert. Die Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Pipettenlösung entsprach der Badlösung (Standardbadlösung mit niedriger Glucosekonzentration) mit zusätzlich 50  $\mu\text{M}$  PS (Stocklösung in DMSO). Je nach Messung wurde außerdem entweder 1  $\mu\text{M}$  Noradrenalin (Stocklösung in DMSO) oder die entsprechende Menge DMSO hinzugefügt.



### **Giant Excised Patch**

Die Giant Excised Patch Methode ist eine Form des Inside-Out-Patch, bei der eine Pipette mit sehr großem Spitzendurchmesser verwendet wird. Die im Jahre 1989 durch Donald W. Hilgemann entwickelte Technik wurde ursprünglich mit Kardiomyozyten durchgeführt [Hilgemann 1989], jedoch auch in abgewandelter Form für Oocyten etabliert. Diese besitzen unter anderem den Vorteil, dass durch Injektion der gewünschten cRNA auf einfache Weise große Mengen des gewünschten Proteins exprimiert werden kann [Goldin 2006]. Die „Giant Patch“-Methode besitzt gegenüber der konventionellen Inside-Out Patch-Clamp Technik einige Vorteile. Sie ermöglicht das Messen von großen Strömen, schnelle Applikation von Lösungen auf die intrazelluläre Seite der Membran und eine gute zeitliche Auflösung aufgrund eines geringen Zugangswiderstands, bedingt durch Verwendung von Pipetten mit großem Spitzendurchmesser [Couey et al. 2002]. Speziell die beiden erstgenannten Punkte waren in der vorliegenden Arbeit ausschlaggebend für die Verwendung dieser Technik. So konnten große TRPM3-Ströme von bis zu mehreren nA gemessen werden und gleichzeitig bestand freier Zugang zur intrazellulären Seite der Plasmamembran, um GTPyS oder  $\beta\gamma$ -Untereinheiten zu applizieren.

### **Präparation der Oocyten**

Oozyten wurden entweder von EcoCyte Bioscience bezogen oder eigenhändig präpariert. Für die Präparation der Oozyten wurde ein Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) zunächst in ein Narkosebad (1 g/L Ethyl 3-Aminobenzoate-Metansulfonat (Sigma-Aldrich) in Leitungswasser) überführt. Nach etwa 20 min war der Frosch in tiefer allgemeiner Narkose, so dass mit der chirurgischen Entnahme der Oozyten begonnen werden konnte. Hierfür wurde der Frosch rücklings in eine mit Eis gefüllte Schale gelegt und der obere Körperbereich mit befeuchtetem Zellstoff abgedeckt, um einer Austrocknung der Haut entgegenzuwirken. Mit einer Schere wurde im Abdominalbereich ein etwa 1 bis 1,5 cm langer longitudinaler Hautschnitt gesetzt und mit einer Pinzette die darunterliegende Bauchdecke gegriffen. Diese wurde vorsichtig etwas angehoben und mit einer Schere ca. 1 cm eingeschnitten. Durch die entstandene Öffnung wurde ein Teil des Ovars herausgezogen, mit einer Schere abgetrennt und das entnommene Stück Ovar in OR2-Lösung (82,5 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM  $MgCl_2$ , 5 mM

HEPES; pH=7,5) überführt. Anschließend wurden die Bauchdecke und die Haut mittels chirurgischem resorbierbaren Faden vernäht. Je nach Größe der Schnitte wurden zwei oder drei Knoten gesetzt. Nach der Operation wurde der Frosch zum Aufwachen in ein mit Leitungswasser gefülltes Becken gelegt. Dabei wurde sichergestellt, dass der Kopf des Frosches über Wasser gelagert wurde, um ein Ertrinken des Tieres während der Aufwachphase zu verhindern.

Das entnommene Stück Ovar wurde anschließend in eine Collagenase-Lösung (OR2 mit 0,5 mg /ml Collagenase: Typ II, Clostridiopepidase A; Sigma-Aldrich) überführt, mit einer Schere zerkleinert und auf einem Schüttler für etwa 2 h inkubiert. Alle 30 min wurde der Verdau mit einer Pasteurpipette durchgerührt und verbleibende größere Stücke weiter mit einer Schere zerkleinert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Oozyten gründlich und mehrfach mit OR2-Lösung gewaschen. Der Waschschrift wurde so lange wiederholt, bis keinerlei Trübung der Lösung erkennbar war. Anschließend wurden die Oozyten in eine Petrischale überführt und mit Hilfe eines Binokulars selektiert. Dabei wurden nur vollständig von Follikelgewebe befreite und intakte Oozyten (im Stadium V-VI; 1-1,2 mm im Durchmesser) ausgewählt. Die ausgewählten Oozyten wurden in ND96-Lösung (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1,8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES, 0,5 g/l PVP (Sigma-Aldrich), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin; pH=7,5) überführt und über Nacht bei 20 °C gelagert. Am nächsten Tag wurde die cRNA injiziert.

### ***cRNA Injektion***

Aliquots der zu injizierenden cRNAs wurden bei -70 °C gelagert. Die Konzentration der einzelnen cRNAs betrug 800-1000 ng/µl und wurde teilweise im Verhältnis 1:1 mit RNase freiem Wasser (mMESSAGE mMACHINE® SP6 Kit; Ambion) verdünnt. Mit Hilfe einer automatischen Microinjektionspipette (Nanject II; Drummond Scientific Company) wurden 69 nl der entsprechenden cRNA-Lösung in die einzelnen Oozyten injiziert. Die verwendeten Injektionspipetten (Glass Capillaries for Nanoliter 2000; World Precision Instruments, Inc.) wurden mittels eines Elektrodenpullers (DMZ-Universal Puller) hergestellt. Anschließend wurden die Oozyten in frische ND96-Lösung überführt, bei 20 °C gelagert und nach 48 bis 72 h Inkubation experimentell verwendet.

### ***„Giant Excised Patch“ Messstand***

Die Messapparatur befand sich auf einem schwingungsisolierten Tisch innerhalb eines Faraday-Käfigs. Der motorisierte Objektstisch war nicht mit dem inversen Mikroskop (Nikon Eclipse TS 100) verbunden, sondern an einer Halterung befestigt und konnte mittels eines Joysticks (Lang) in X-, Y- und Z-Richtung über dem Mikroskop bewegt werden. Der Objektstisch besaß eine etwa 6 cm große Aussparung, in die der Oozytenhalter eingesetzt wurde. Der Halter hatte in der Mitte ein Loch, auf das ein Deckgläschen geklebt wurde. Auf dieses Deckgläschen wurde während der Messungen mittig die Oozyte platziert und konnte von unten mit Hilfe des Mikroskops betrachtet werden. In einem Abstand von etwa 1 cm vom Bodendeckgläschen wurde ein weiteres Deckgläschen platziert, so dass sich bei Einlaufen von Badlösung eine Wassersäule zwischen den beiden Gläsern bilden konnte. Die Badlösung wurde seitlich über eine Kanüle, verbunden mit einem gravitationsbetriebenen Perfussionssystem, zwischen die Deckgläschen geleitet und überschüssige Lösung wurde mittels einer Pumpe abgesaugt. Der Patch-Clamp Vorverstärker samt Elektrodenhalter mit chloridiertem Silberdraht war auf einem mechanischen Mikromanipulator (Linos Photonics) befestigt. Mit dessen Hilfe konnte die Messpipette von der rechten Seite in die Wassersäule eingeführt werden und vor der Oozyte positioniert werden. Der Vorverstärker war mit dem Hauptverstärker (EPC10; HEKA) verbunden, der wiederum durch einen Computer unter Verwendung der Patchmaster Software (HEKA) angesteuert wurde. Die Referenzelektrode bestand ebenfalls aus einem chloridierten Silberdraht und wurde neben der Perfusion platziert um sicherzustellen, dass sie dauerhaft Kontakt zur Wassersäule hatte. Für die Substanzapplikation wurde entweder ein selbstgebautes, gravitationsbetriebenes Perfusionssystem oder eine Applikationspipette verwendet. Die Applikationspipette wurde in den Pipettenhalter des Picospritzers (PDES-DXH; npi) eingeführt und von der linken Seite in die Wassersäule eingebracht. Die Picospritzerpipetten wurden aus Borosilikatglaskapillaren (Außendurchmesser: 1,5 - 1,8 mm; Wanddicke: 0,2 mm; Kimble Glass Inc.) mit Hilfe eines Elektrodenpullers (DMZ-Universal Puller) hergestellt und die Applikationsspitze bis zur gewünschten Form und Öffnungsgröße poliert (Polisher ALA CPM-2 mit inversem Mikroskop, Platinum-Iridium-Draht (Durchmesser: 0,25 mm)). Das selbstgebaute

Applikationssystem wurde ebenfalls von der linken Seite in die Wassersäule eingeführt.

Für die Herstellung der Messpipetten wurde Borosilikatglaskapillaren (Außendurchmesser: 2,0 mm; Innendurchmesser: 1,0 mm; Hilgenberg) und ein Elektrodenpuller verwendet. Die so entstandenen Pipetten wurden anschließend noch poliert, so dass man eine einheitliche und glatte Spitze erhielt und der Pipettenwiderstand zwischen 250 und 500 k $\Omega$  lag.

### ***Durchführung der „Giant Excised Patch“ Messungen***

Die Oozyten sind zunächst noch von einer durchsichtigen Vitellinhülle umgeben. Bei dieser Hülle handelt es sich um eine Glycoproteinmatrix, die der Plasmamembran aufliegt und der Oozyte mechanische Stabilität verleiht und hilft, ihre sphärische Form beizubehalten [Sherman-Gold et al. 1993]. Da diese Vitellinhülle verhindert, dass man mit der Pipette an die Plasmamembran gelangt, muss sie zuvor manuell entfernt werden. Dafür wurde die Oozyte zunächst in eine Petrischale mit hyperosmolarer Lösung (200 mM Natriumaspertat, pH 7,4) transferiert und für mehrere Minuten inkubiert, bis die Oozyte etwas schrumpfte. Die nun nur noch locker der Oozyte aufliegende Vitellinhülle konnte bei schräger Beleuchtung unter einem Binocular identifiziert werden. Mittels zweier Pinzetten wurde sie vorsichtig gegriffen, zerrissen und von der Oozyte abgestreift. Die devitellinisierten Oozyten wurden anschließend vorsichtig in die Messkammer überführt und dort für mehrere Minuten ruhen gelassen, um ein Anhaften der Oocyte an das Bodendeckgläschen zu gewährleisten. Um die „Seal“-Bildung der Messpipette zu verbessern, wurde diese zunächst mit der Spitze in flüssiges Paraffin (für Spektroskopie; Merck) getaucht und anschließend kurz unter fließendem Leitungswasser abgespült. Anschließend wurde die Pipette mit der entsprechenden Pipettenlösung befüllt und in den Pipettenhalter des Vorverstärkers gespannt. Ein starker Überdruck wurde angelegt und die Messpipette ein Stück vor der Oozyte platziert. Durch Bewegen des Objektisches wurde die Oozyte zügig an die Pipette herangeführt. Nachdem die Pipette deutlich in Kontakt mit der Oozytenmembran gekommen war und diese etwas eindrückte, wurde der Überdruck schlagartig abgelassen. Die Bildung eines „Giga-Seal“ konnte innerhalb von wenigen Sekunden oder mehreren Minuten vonstatten gehen. Durch ruckartiges, tiefes

Eindringen und schnelles Herausziehen der Messpipette aus der Oocyte konnte die Excised-Patch-Konfiguration erreicht werden. Basis hierfür war ein stabiler „Giga-Seal“ und ein schnelles Ausführen der Bewegung. Die Messpipette konnte nun vor der Applikationspipette bzw. dem Applikationssystem positioniert werden. Dabei war zu beachten, dass sich der Membranpatch exakt vor der Öffnung der Applikation befand, um ein fehlerfreies Applizieren zu gewährleisten.

Für die Applikation der  $\beta\gamma$ -Untereinheiten wurde der Picospritzer samt Applikationspipette verwendet. Applikations- und Haltedruck wurden empirisch für jede Applikationspipette vor der eigentlichen experimentellen Verwendung bestimmt und variierten aufgrund unterschiedlicher Öffnungsdurchmesser. Der Applikationsdruck lag zwischen 0,03 und 0,07 bar und der Haltedruck zwischen 0,012 und 0,017 bar. Für alle weiteren Messungen wurde das Perfusionssystem verwendet. Dieses bestand aus drei separaten Kanälen. Die Applikation der Substanzen erfolgte durch Verschieben der Messpipette (mit Membranpatch) vor den entsprechenden Applikationskanal.

Für die eigentliche Messung wurden Spannungsrampen von -100 mV bis 100 mV bei einem Haltepotential von 0 mV appliziert. Die hier angegebenen Spannungswerte sind nicht für das „liquid junction potential“ (LJP) korrigiert. Die Rampenfrequenz lag bei 1 Hz. Der genaue Aufbau des Spannungsrampenprotokolls ist Abbildung 3-2 zu entnehmen.

### **Analyse und Auswertung der Patch-Clamp Experimente**

Die elektrophysiologischen Daten wurden mit Hilfe des Programms Igor Pro (Wave-metrics) ausgewertet. Dabei wurde die Daten zunächst um das „liquid junction potential“ (LJP), der Potenzialdifferenz zwischen Badlösung und Pipettenlösung, korrigiert (-15 mV bei Whole-Cell Messungen; -4,6 mV bei den Giant Excised Patch Messungen). Die Berechnung dieses Potentials erfolgte mit dem Programm Clampex 8.1 (Axon Instruments). Die in der Whole-Cell-Konfiguration und im Giant-Patch gemessenen Ströme wurden bei -80 mV und +80 mV, die Messungen in der Cell-Attached-Konfiguration bei nominal +180 mV ausgewertet. Die graphische Darstellung der Messungen erfolgte mit den Programmen Origin 7 (Origin Lab Corporation) und Corel Draw 12 (Adobe).

### 3.6 Molekularbiologie

Die molekularbiologischen Arbeiten wurden von Dr. Sachar Lambert, Sandra Plant, Melanie Portz, Raissa Wehmeyer und Dr. Marc Behrendt durchgeführt. Eine Auflistung der verwendeten Konstrukte bzw. Kontrollvektoren ist unter Tabelle 3-2 und Tabelle 3-3 zu finden.

Konstrukte	Vektor	Herkunft
GIRK1/2	pGem	Prof. D. Oliver
G $\alpha_{i1QtoL}$	pcDNA3	Prof. M. Zhu
G $\alpha_{i1WT}$	pcDNA3.1+	cdna.org
G $\alpha_{o1QtoL}$	pcDNA3	Prof. M. Zhu
G $\alpha_{o1WT}$	pKNH	Prof. M. Zhu
G $\beta_1$	pcMV	Prof. M. Bünemann
G $\beta_1$	pMT2	Prof. M. Zhu
G $\beta_2$	pcDNA3	Prof. M. Bünemann
G $\beta_3$ long	pcDNA3	Prof. M. Bünemann
G $\beta_4$	pcDNA3.1+	cdna.org
G $\beta_5$ long	pcDNA3.1+	cdna.org
G $\beta_5$ short	pcDNA3.1+	cdna.org
G $\gamma_1$	pcDNA3.1+	cdna.org
G $\gamma_{13}$	pcDNA3.1+	cdna.org
G $\gamma_2$	pcDNA3	Prof. M. Zhu
G $\gamma_3$	pcDNA3.1+	cdna.org
G $\gamma_4$	pcDNA3.1+	cdna.org
G $\gamma_5$	pcDNA3.1+	cdna.org
G $\gamma_7$	pcDNA3.1+	cdna.org
mGluR6	pCAGGSL1	laborintern kloniert
Muskarinischer M1-Rezeptor	pSGHVO	Prof. D. Oliver
myr-Phosducin	pCAGGSL1	Prof. M. Bünemann; modifiziert
myr- $\beta$ -ARKct	pCAGGSL1	Prof. M. Bünemann; modifiziert
PKC $\gamma$ C1	pEGFP-N1	Prof. D. Oliver
PLC $\delta$ 1-PH	pcDNA3	Prof. D. Oliver
RGS7	pcDNA3.1+	cdna.org
TRPM1 $\Delta$ Ex11	pCAGGSL1	Dr. S. Lambert
TRPM3 $\alpha$ 2	pCAGGSL1	Dr. S. Lambert, S. Plant
TRPM3 $\alpha$ 2	pBF1	Prof. B. Fakler
TRPM3 $\alpha$ 3	pCAGGSM2	Dr. S. Philipp
TRPM3 $\alpha$ 4	pCAGGSM2	Dr. S. Philipp
TRPM3 $\alpha$ 5	pCAGGSM2	Dr. S. Philipp
TRPM3 $\alpha$ 6	pCAGGSM2	Dr. S. Philipp
$\alpha_{2A}$ -Adrenorezeptor	pcDNA3	Prof. M. Bünemann
$\alpha_{2A}$ -Adrenorezeptor-YFP	pcDNA3	Prof. M. Bünemann
$\alpha_{2B}$ -Adrenorezeptor	pcDNA3.1+	cdna.org
$\alpha_{2C}$ -Adrenorezeptor	pcDNA3.1+	cdna.org

**Tabelle 3-2:** Liste der verwendeten Konstrukte. Bei  $\alpha_{2A}$ -Adrenorezeptor-YFP handelt es sich um ein Fusionsprotein aus dem  $\alpha_{2A}$ -Adrenorezeptor und YFP.

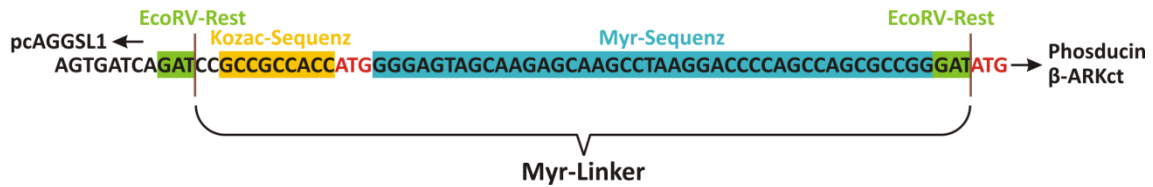
Kontrollvektoren	Herkunft
pCAGGSL1	Dr. S. Lambert
pcDNA3	Invitrogen
pcDNA3-IRESGFP	Prof. V. Flockerzi

**Tabelle 3-3:** Liste der verwendeten Kontrollvektoren

Für die Plasmidaufreinigung wurde entweder das NucleoBond Xtra Midi-Kit (Macherey-Nagel) oder das Endofree Plasmid-Purifikation-Kit (Qiagen) verwendet. Bei beiden Kits wird die DNA mit Hilfe von Anionenaustauscher-Säulen aufgereinigt. Dabei werden die Bakterien zunächst lysiert und das gesamte Lysat auf eine Säule gegeben. Die negativ geladene DNA bindet an positiv geladenen Gruppen der entsprechenden Säule und kann letztendlich durch Zugabe eines Puffers (mit einer bestimmten Salzkonzentration) vom Säulenmaterial eluiert werden. Unerwünschte Bestandteile (u. a. Proteine und mRNA) werden zuvor durch mehrfache Waschschriffe von der Säule ausgewaschen. Bei der Durchführung wurde sich an die Anleitung des entsprechenden Herstellers gehalten.

Wie aus Tabelle 3-2 ersichtlich ist, wurde der Großteil der verwendeten Konstrukte entweder käuflich erworben (cDNA.org) oder von anderen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt. Selbst generiert wurde lediglich der mGluR6-Klon bzw. wurden die Phosducin- und  $\beta$ -ARKct-Klone modifiziert. Im Folgenden werden die Klonierungsstrategie des mGluR6-Konstruktes bzw. die durchgeführten Modifikationen kurz erläutert.

Zur Generierung des mGluR6-Konstruktes wurde zunächst die gesamte RNA aus der Retina von Mäusen (BL6/C57) gewonnen (Ambion). Die extrahierte RNA wurde anschließend mit Hilfe des Superscript-II-RT-Kit und Oligo(dT)-Primern (Invitrogen) in cDNA umgeschrieben und im Folgenden die gewünschte mGluR6-cDNA mittels PCR amplifiziert. Die erhaltene mGluR6-cDNA wurde anschließend in den pBS-Vektor (linearisiert mit EcoRV) ligiert. Danach wurden kompetente *E. coli* Bakterien mit dem mGluR6-pBS-Konstrukt transformiert. Nach der anschließenden Plasmidisolierung wurde das Konstrukt zur Überprüfung sequenziert (Starseq). Die korrekte mGluR6-cDNA wurde danach erneut mit Hilfe einer PCR amplifiziert und mit Hilfe des Restriktionsenzym EcoRV in pCAGGSL1 subkloniert. Die korrekte Insertion wurde



**Abbildung 3-3:** Gezeigt ist der Myristoylierungslinker (Myr-Linker) der Phosducin und  $\beta$ -ARKct angefügt wurde. Start-Codons sind in Rot dargestellt.

erneut mittels Sequenzierung überprüft. Die Plasmidaufreinigung wurde mit dem Endofree Plasmid-Purifikation-Kit (Qiagen) durchgeführt.

Den beiden  $\beta$ -Scavenger Phosducin und  $\beta$ -ARKct wurde jeweils ein Myristoylierungslinker angefügt. Der Linker selbst (siehe Abb. 3-3) wurde synthetisiert (Eurofins MWG Operon) und anschließend in den durch EcoRV verdauten pcAGGSL1-Vektor ligiert. Am Ende des Linkers befand sich ein EcoRV-Rest (GAT), damit nach Einfügen des Linkers in den Vektor die EcoRV-Schnittstelle erhalten blieb. Nach der anschließenden Plasmidisolation wurde der Myr-pcAGGSL1-Vektor zur Überprüfung sequenziert (Starseq). Phosducin und  $\beta$ -ARKct wurden anschließend mittels PCR amplifiziert und in den mit EcoRV geschnittenen Myr-pcAGGSL1-Vektor ligiert. Die Sequenz wurde erneut mittels Sequenzierung überprüft und in beiden Fällen wurde die abschließende Plasmidaufreinigung mit dem Endofree Plasmid-Purifikation-Kit (Qiagen) durchgeführt.

Als Kontrollvektoren wurden pcDNA, pcDNA3-IRESGFP und pcAGGSL1 verwendet. Die beiden letztgenannten Konstrukte beinhalten eine Ires-GFP-Sequenz. Im Falle des pcAGGSL1-Vektors handelt es sich um eine leicht abgewandelte Form des pcAGGSM2-Vektors, bei dem die „multiple cloning site“ modifiziert wurde und die HpaI-Restriktionsstellen entfernt wurden [Lambert et al. 2011].

Bei allen Transfektionen, bei denen sich das entsprechende Konstrukt nicht in einem pcAGGSL1- oder pcAGGSM2- (enthält ebenfalls eine Ires-GFP-Sequenz) Vektor befand, wurde pcAGGSL1 oder pcDNA3-IRESGFP co-transfiziert, um durch die Expression des GFP transfizierte Zellen von untransfizierten Zellen unterscheiden zu können.

Für die Herstellung der TRPM3 $\alpha$ 2 cRNA wurde das TRPM3 $\alpha$ 2-pBF1-Konstrukt und für die Synthese der GIRK1/2 cRNA das GIRK1/2-pGem-Konstrukt verwendet. Zunächst



wurden die Vektoren linearisiert (TRPM3 $\alpha$ 2-pBF1 mit MluI; GIRK1/2-pGem mit Scal). Für die eigentliche cRNA-Synthese wurde für TRPM3 $\alpha$ 2 das mMESSAGE mMACHINE® SP6 Kit (Ambion) und für GIRK1/2 das mMESSAGE mMACHINE® T7 Kit (Ambion) verwendet. Die cRNA-Synthese wurde bei 37° C für 2h durchgeführt. Danach wurden durch Zugabe einer DNase die verbleibenden linearisierten Vektoren abgebaut (15 min bei 37° C). Nach LiCl-Alkoholfällung über Nacht wurde die cRNA mehrfach mit 80 %iger Ethanollösung gewaschen und in RNase-freiem Wasser resuspendiert. Die cRNA wurde bei -80° C gelagert.

### 3.7 Statistik

Die statistische Analyse der Daten wurde mit Excel 2003 (Microsoft), Origin 7 (Origin Lab Corporation) oder Graphpad prism 3.0 durchgeführt. Alle in dieser Arbeit gezeigten Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Signifikanzen wurden mittels zweiseitigen T-Tests nach Student (je nach den vorliegenden Bedingungen gepaart oder ungepaart) oder ANOVA-Varianzanalysen (mit Newmann-Keuls Post-Test) überprüft. Der Signifikanzwert (p-Wert) wurde für  $p < 0,05$  mit \*, für  $p < 0,01$  mit \*\* und  $p < 0,001$  mit \*\*\* angegeben.

### 3.8 Lösungen

#### Lösungen für die Ca<sup>2+</sup>-Imaging und Patch-Clamp Experimente

Standardbadlösung (niedrige Glucosekonzentration) enthielt in mM: 145 NaCl, 10 CsCl, 3 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 3 D-Glucose, 7 D-Mannitol. Zur Einstellung des pH-Wertes auf 7,2 wurde NaOH (2 M) verwendet (3,4 – 3,7 mM Na<sup>+</sup> zusätzlich). Die Osmolalität lag im Bereich von 320 bis 330 mOsm.

Badlösung (hoch Glucose) enthielt (in mM): 145 NaCl, 10 CsCl, 3 KCL, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 10 D-Glucose. Zur Einstellung des pH-Wertes auf 7,2 wurde NaOH (2 M) verwendet (3,4 – 4,2 mM Na<sup>+</sup> zusätzlich). Die Osmolalität lag im Bereich von 320 bis 330 mOsm.

Standardintrazellulärlösung enthielt (in mM): 120 CsOH, 10 BAPTA, 50 CsCl, 80 Aspartic Acid, 4 Na<sub>2</sub>ATP, 3 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES. Zur Einstellung des pH-Wertes auf 7,2 wurde CsOH (2 M) verwendet (22,5 mM Cs<sup>+</sup> zusätzlich). Die Osmolalität lag bei 300 mOsm.

Intrazellulärlösung mit AMP-PNP enthielt (in mM): 120 CsOH, 10 BAPTA, 50 CsCl, 80 Aspartic Acid, 4 Li<sub>4</sub>AMP-PNP, 1 Na<sub>2</sub>GTP, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES. Zur Einstellung des pH-Wertes auf 7,2 wurde CsOH (2 M) verwendet (21 mM Cs<sup>+</sup> zusätzlich). Die Osmolalität lag bei 310 mOsm.

Intrazellulärlösung ohne AMP-PNP enthielt (in mM): 120 CsOH, 10 BAPTA, 50 CsCl, 80 Aspartic Acid, 4 Na<sub>2</sub>ATP, 1 Na<sub>2</sub>GTP, 3 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES. Zur Einstellung des pH-Wertes auf 7,2 wurde CsOH (2 M) verwendet (28 mM Cs<sup>+</sup> zusätzlich). Die Osmolalität lag bei 310 mOsm.

Intrazellulärlösung ohne Mg<sup>2+</sup>: enthielt (in mM): 80 CsAspartat, 45 CsCl, 10 BAPTA, 10 HEPES, 5 EDTA, 4 Na<sub>2</sub>ATP. Zur Einstellung des pH-Wertes auf 7,2 wurde CsOH (2 M) verwendet (60 mM Cs<sup>+</sup> zusätzlich). Die Osmolalität lag im Bereich von 310 bis 315 mOsm.

### **Lösungen für die „Giant Patch“-Experimente**

Badlösung enthielt (in mM): 130 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 1 EGTA, 2 Na<sub>2</sub>ATP, 10 HEPES. Zur Einstellung des pH-Wertes auf 7,5 wurde KOH (1 M) verwendet (10 - 12 mM K<sup>+</sup> zusätzlich). Die Osmolalität lag bei 260 mOsm.

GIRK1/2 Pipettenlösung enthielt (in mM): 144 KCl, 2 NaCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 10 HEPES. Zur Einstellung des pH-Wertes auf 7,5 wurde KOH (1 M) verwendet (5 mM K<sup>+</sup> zusätzlich). Die Osmolalität lag bei 240 mOsm.

TRPM3 Pipettenlösung enthielt (in mM): 115 NaCl, 5 KCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 10 HEPES. Zur Einstellung des pH-Wertes auf 7,3 wurde NaOH (2 M) verwendet (3,8 mM Na<sup>+</sup> zusätzlich). Die Osmolalität lag bei 240 mOsm. Kurz vor Beginn der Messungen wurde 50 µM PS hinzugegeben. Die DMSO Konzentration betrug somit 0,01 %.

Die Osmolalität der Lösungen wurde entweder mit einem Gefrierpunkt-Osmometer (Osmomat 030; Gonotec) oder einem Dampfdruck-Osmometer (Vapro Modell 5520; Wescor) bestimmt.

### Stocklösungen

Substanz	Abk.	Konzentration	Lösungsmittel	Hersteller
3-Isobutyl-1-methylxanthine	IBMX	100 mM	DMSO	Sigma-Aldrich
Adrenalin	Adr	10 mM	DMSO	Sigma-Aldrich
Amylcinnamoylanthranicilsäure	ACA	50 mM	DMSO	Calbiochem
Bisindolylmaleimid IV	BIM	10 mM	DMSO	Sigma-Aldrich
Clonidin	Clo	10 mM	DMSO	Sigma-Aldrich
Forskolin	For	50 mM	DMSO	Sigma-Aldrich
Guanosin 5'-O-[ $\gamma$ -thio]-triphosphat	GTP $\gamma$ S	20 mM	H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich
Guanosine 5'-[ $\beta$ -thio]-diphosphate	GDP $\beta$ S	40 mM	H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich
H-89 dihydrochloride hydrate	H89	50 mM	DMSO	Sigma-Aldrich
Isoproterenol	Iso	50 mM	DMSO	Sigma-Aldrich
KT5720	KT5720	10 mM	DMSO	Sigma-Aldrich
mSIRK	mSIRK	30 mM	DMSO	Calbiochem
mSIRK <sub>L9A</sub>	mSIRK <sub>L9A</sub>	30 mM	DMSO	Calbiochem
Nifedipin	Nif	50 mM	DMSO	Sigma-Aldrich
Noradrenalin	NA	2; 4; 10 mM	DMSO	Sigma-Aldrich; Alfa Aesar
Oxotremorin-M	OxoM	20 mM	H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich
Pertussis Toxin von <i>Bordetella pertussis</i>	PTX	100 ng/ $\mu$ L	H <sub>2</sub> O	List Biological Lab. Inc.
Prazosin	Pra	25 mM	DMSO	Sigma-Aldrich
Pregnenolonsulfat	PS	50 mM	DMSO	Sigma-Aldrich; Stearloids
Propranolol	Pro	50 mM	DMSO	Sigma-Aldrich
Somatostatin-14	SST-14	1 mM	DMSO	Bio Trend
Staurosporine	Stauro	1 mM	DMSO	Sigma-Aldrich
Thapsigargin	-	50 $\mu$ M	DMSO	Sigma-Aldrich
Yohimbin	Yoh	20; 50 mM	DMSO	Sigma-Aldrich

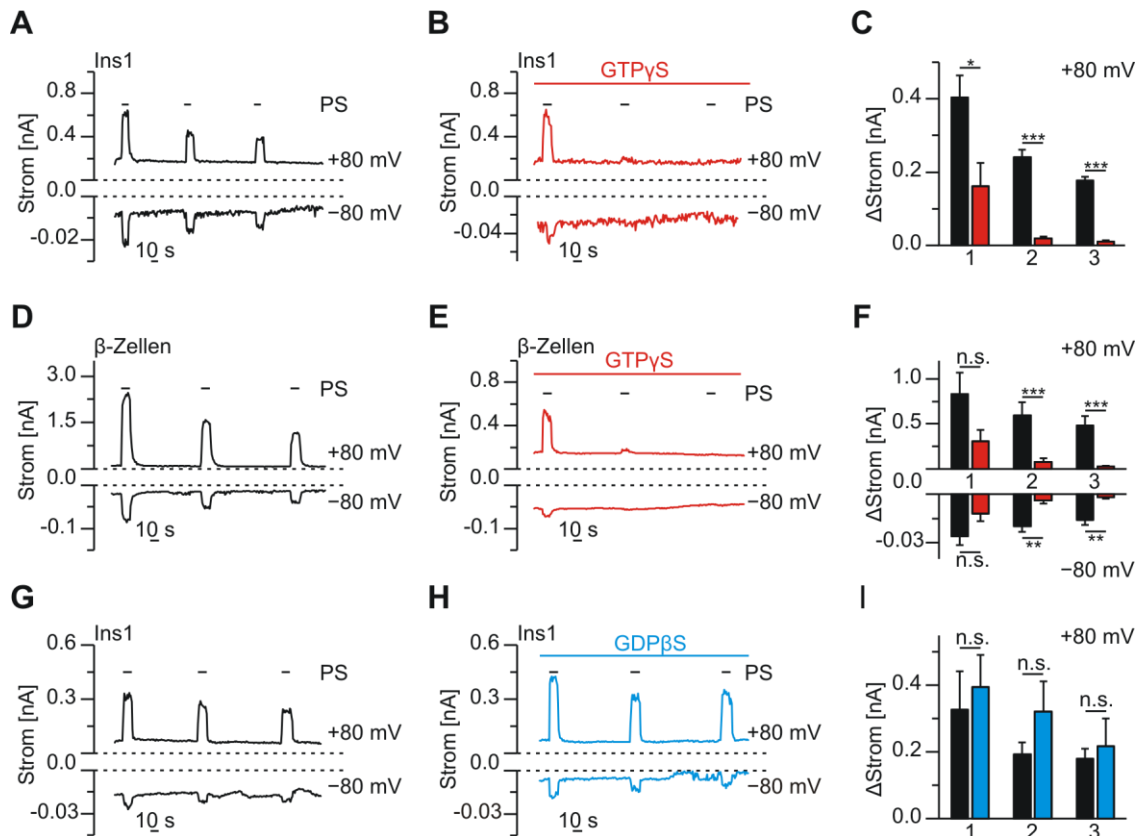
**Tabelle 3-4:** Stocklösungen der verwendeten Substanzen

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Signalwegen führt zu einer Inhibierung von TRPM3

Um eine generelle Regulation bzw. Modulation der TRPM3-Aktivität in  $\beta$ -Zellen durch G-Protein-gekoppelte Signalwege zu untersuchen, wurden zunächst Patch-Clamp Experimente mit GTP $\gamma$ S (Guanosin 5'-O-[ $\gamma$ -thio]-triphosphat) durchgeführt. Bei GTP $\gamma$ S handelt es sich um ein nicht hydrolysierbares Analogon von GTP (Guanosin-triphosphat), das als allgemeiner Aktivator von G-Proteinen angesehen werden kann [Gilman 1987]. Wird es in Zellen eingebracht, kommt es zu einem Austausch von GDP zu GTP $\gamma$ S an den  $\alpha$ -Untereinheiten der G-Proteine und somit werden nach und nach alle G-Proteine in einen aktivierten Zustand überführt. Da GTP $\gamma$ S nicht hydrolysiert werden kann, bleiben die G-Proteine dauerhaft aktiviert. Dieser Vorgang erfolgt an allen  $\alpha$ -Untereinheiten, wodurch alle G-Protein-gekoppelten Signalwege unspezifisch aktiviert werden.

Messungen wurden sowohl mit Ins1 Zellen (Abb. 4-1 A-C) als auch mit primären  $\beta$ -Zellen der Maus (Abb. 4-1 D-F) durchgeführt. Als Kontrolle wurden Messungen ohne GTP $\gamma$ S vorgenommen. Während der Messungen wurde innerhalb von zwei Minuten dreimal PS appliziert, um TRPM3 zu aktivieren. Sowohl in Kontrollmessungen mit Ins1 Zellen als auch in primären  $\beta$ -Zellen (Abb. 4-1 A, D) ist deutlich zu erkennen, dass alle PS-Applikationen sowohl Einwärts-, als auch Auswärtsströme hervorrufen. Auf die erste Applikation zeigte sich in der Regel eine größere Stromantwort als auf die nachfolgenden Applikationen. Doch trotz der Abnahme des Stroms zeigte sich bei jedem PS-Stimulus eine deutliche Stromantwort. Bei Messungen mit GTP $\gamma$ S wurde 400  $\mu$ M GTP $\gamma$ S in der Pipettenlösung gelöst, welches so nach Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration in die gemessenen Zellen hineindiffundieren konnte. Auch hier wurde im gleichen Intervall dreimal PS appliziert. Bei diesen Messungen zeigte sich eine starke Verminderung der TRPM3-Ströme (Abb. 4-1 B, E). Die erste PS-Applikation führte in beiden Zelltypen noch zu deutlichen TRPM3-Strömen, jedoch bereits bei der zweiten Applikation waren die Ströme drastisch verkleinert. Bei der dritten Applikation war so gut wie kein Strom mehr messbar. Die Statistik (Abb. 4-1 C, F) veranschaulicht, dass es sich bei der Hemmung der TRPM3-Stöme durch GTP $\gamma$ S um einen signifikanten Effekt



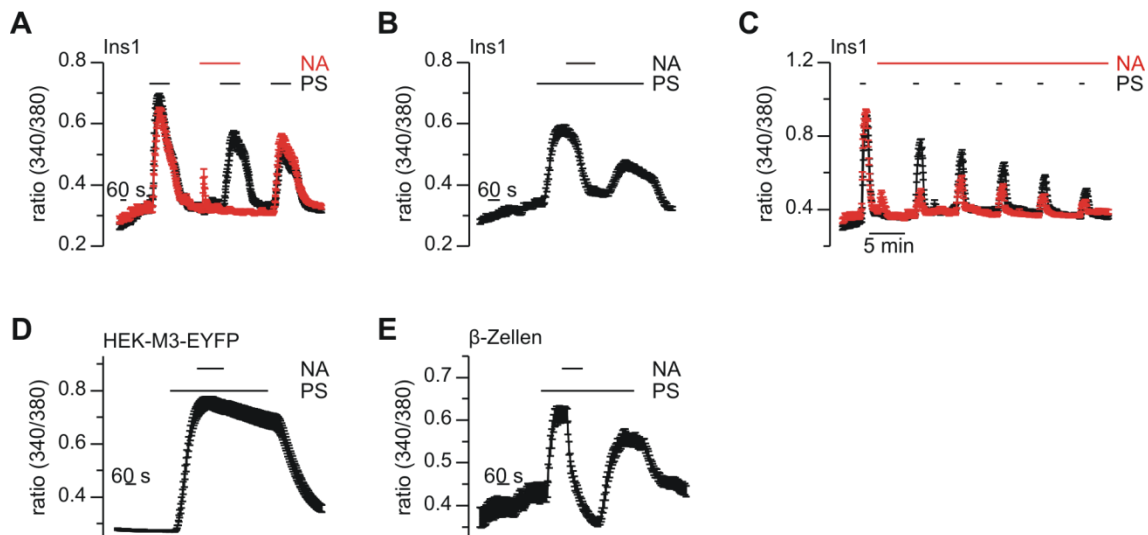
**Abbildung 4-1: Unspezifische Aktivierung von G-Proteinen führt zu einer Hemmung der TRPM3-Aktivität in Ins1 und primären  $\beta$ -Zellen.** Whole-Cell Patch-Clamp Messungen mit Ins1 (**A-C**; **G-I**) und primären  $\beta$ -Zellen (**D-F**). In allen Experimenten wurde jeweils dreimal an den angegebenen Zeitpunkten 50  $\mu$ M PS appliziert. Die Ströme werden bei +80 mV und -80 mV dargestellt. Zu beachten ist, dass die Achsen der einzelnen Abbildungen teilweise unterschiedlich skaliert sind (dies gilt für alle Abbildungen in der vorliegenden Arbeit) **A**, **D** und **G** zeigen Kontrollmessungen ohne GTP $\gamma$ S. **B** und **E** zeigen Beispielmessungen mit 400  $\mu$ M GTP $\gamma$ S in der Pipettenlösung. **C** Statistik zu den in A und B gezeigten Messungen (Kontrolle n=5; GTP $\gamma$ S n=8). **F** Statistik zu den in D und E gezeigten Messungen (Kontrolle n=8; GTP $\gamma$ S n=7). **H** Beispielmessung mit 400  $\mu$ M GDP $\beta$ S in der Pipettenlösung. **I** Statistik zu den in G und H gezeigten Messungen (Kontrolle n=5; GDP $\beta$ S n=6). In den Statistiken werden die jeweiligen gemittelten Stromstärken während der PS-Applikation, abzüglich des basalen Stroms (vor PS-Applikation), als  $\Delta$ Strom dargestellt. Die Nummern entsprechen den jeweiligen PS-Applikationen. Kontrollmessungen werden durch schwarze Balken repräsentiert. Messungen mit GTP $\gamma$ S sind als rote Balken und Messungen mit GDP $\beta$ S als blaue Balken dargestellt.

handelt. Dass die Stromantwort auf die erste PS-Applikation noch relativ groß ausfällt, lässt sich damit erklären, dass zu Beginn der Messung noch nicht genügend GTP $\gamma$ S in die Zellen hineindiffundiert war, da die Messung bereits kurz nach Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration gestartet wurde bzw. der Austausch von GDP zu GTP $\gamma$ S nur langsam vonstatten geht. Anschließend wurden Kontrollmessungen mit GDP $\beta$ S durchgeführt, das zu einer Inaktivierung von G-Proteinen führt [Burch & Axelrod 1987].

GDP $\beta$ S wurde hierfür, ebenso wie GTP $\gamma$ S, der Pipettenlösung hinzugegeben und konnte nach Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration in das Cytosol der Zellen gelangen (Abb. 4-1 H, I). Die Experimente wurden entsprechend den Messungen mit GTP $\gamma$ S durchgeführt. Die Messungen mit GDP $\beta$ S zeigten zwar, im Vergleich zu Kontrollmessungen ohne GDP $\beta$ S, eine leichte Steigerung der PS induzierten Ströme, dieser Effekt war jedoch nicht signifikant (Abb. 4-1 I). Die Experimente in Abbildung 4-1 zeigen, dass eine generelle Aktivierung von G-Protein zu einer Inhibierung von TRPM3 führt. Dies lieferte den ersten Hinweis auf einen oder mehrere G-Protein-gekoppelte Signalwege, die die TRPM3-Aktivität in  $\beta$ -Zellen modulieren.

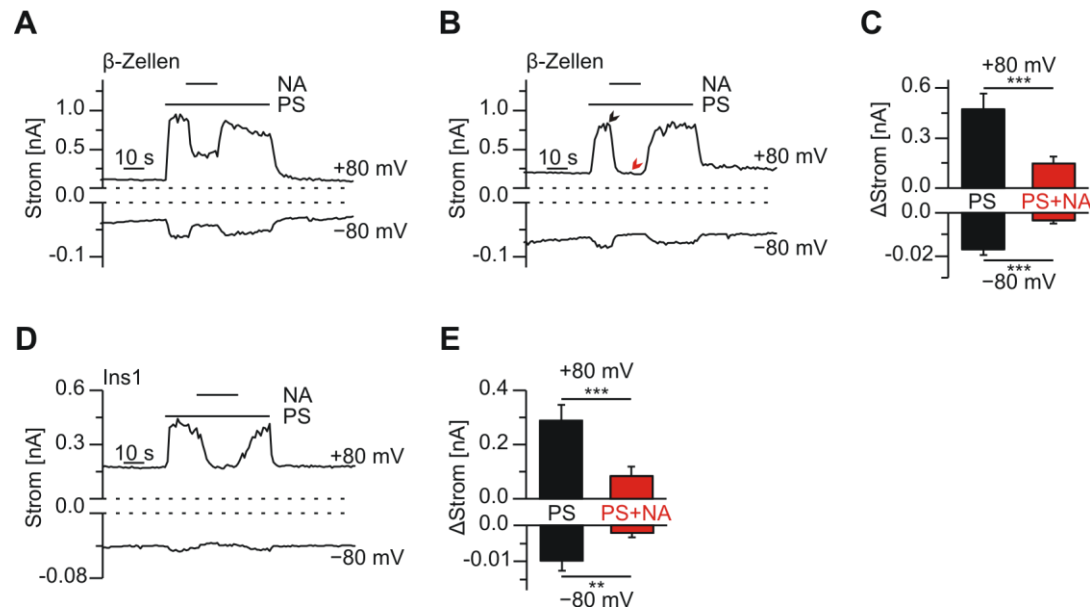
#### **4.2 Noradrenalin inhibiert TRPM3 in primären $\beta$ -Zellen der Maus und in Ins1 Zellen**

Da Noradrenalin einen inhibierenden Effekt auf die Insulinausschüttung hervorruft und ein direkter Effekt auf  $\beta$ -Zellen schon lange bekannt ist (siehe 1.11), wurde getestet, ob Noradrenalin auch die TRPM3-Aktivität in  $\beta$ -Zellen modulieren kann. Um dies zu prüfen, wurden zunächst  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging Experimente in Ins1 Zellen durchgeführt. Aus Abbildung 4-2 A ist ersichtlich, dass Noradrenalin (50  $\mu\text{M}$ ) das durch PS hervorgerufene  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal vollständig inhibiert (rote Kurve). Nach Auswaschen des Katecholamins zeigen die Zellen auf einen PS-Stimulus jedoch ein vergleichbares  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal wie Zellen in Kontrollmessungen ohne vorherige Noradrenalin-Applikation (schwarze Kurve). Die durch Noradrenalin vermittelte Hemmung ist somit reversibel. Da in diesen Experimenten Noradrenalin bereits vor dem zweiten PS-Stimulus appliziert wurde, lässt sich anhand dieser Messungen jedoch keine Aussage darüber treffen, wie schnell die Inhibition vonstatten geht. Im Folgenden wurde deshalb ein anderes Applikationsprotokoll gewählt, bei dem zunächst PS appliziert wird, um TRPM3-Kanäle zu aktivieren, und anschließend Noradrenalin zusätzlich appliziert wird. Danach wird Noradrenalin herausgewaschen, PS aber weiterhin appliziert, um zu überprüfen, ob die Inhibition reversibel ist. Die Messungen wurden mit Ins1 Zellen (Abb. 4-2 B) und primären  $\beta$ -Zellen durchgeführt (Abb. 4-2 E). In beiden Zelltypen zeigt Noradrenalin eine starke, reversible und relativ schnelle Inhibition des durch PS induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals. Weiterhin zeigen die Messungen, dass bereits deutlich geringere Noradrenalin-Konzentrationen, als die in Abbildung 4-2 A verwendeten 50  $\mu\text{M}$ , ausreichend sind



**Abbildung 4-2: Noradrenalin inhibiert TRPM3 in primären  $\beta$ -Zellen und in Ins1 Zellen.** Die Wirkung von Noradrenalin auf die TRPM3-Aktivität wurde mittels  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging Experimenten untersucht. Gezeigt wird das gemittelte Fura-2-Signal. Die PS-Konzentration betrug in allen Messungen 50  $\mu\text{M}$ . **(A)** Ins1 Zellen mit (rote Kurve;  $n=57$ ) und ohne Noradrenalin (50  $\mu\text{M}$ ) Applikation (schwarze Kurve;  $n=57$ ). Die dreimalige PS-Stimulation gilt für beide Kurven. **(B)** Noradrenalin-bedingte (20 nM), schnelle Reduktion des PS induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals in Ins1 Zellen. **(C)** Ins1 Zellen mit (rote Kurve;  $n=75$ ) und ohne (schwarze Kurve;  $n=75$ ) 30 minütige Noradrenalin-Applikation (100 nM). Mehrfache PS-Applikation gilt für beide Kurven. **(D)** HEK293 Zellen, die stabil TRPM3 $\alpha 2$  exprimieren (HEK-M3-EYFP), zeigen keine Reduktion des PS-Signals durch Co-Applikation von Noradrenalin (2  $\mu\text{M}$ ) ( $n=76$ ). **(E)** Noradrenalin (2  $\mu\text{M}$ ) induziert eine starke, schnelle und reversible Inhibition der TRPM3-Aktivität in primären  $\beta$ -Zellen der Maus ( $n=38$ ).

(Abb. 4-2 B, 20nM; Abb. 4-2 E, 2  $\mu\text{M}$ ), um die TRPM3-Aktivität zu hemmen. Die Hemmung der TRPM3-Kanäle ist außerdem bei dauerhafter Applikation von Noradrenalin beständig (Abb. 4-2 C) und selbst nach 25 Minuten kontinuierlicher Noradrenalin-Applikation (100 nM) zeigen die mit Noradrenalin behandelten Zellen (rote Kurve) ein geringeres Fura-2-Signal bei PS-Stimulation als Kontrollzellen (schwarze Kurve). Eine direkte Interaktion von Noradrenalin mit den TRPM3-Kanälen kann ausgeschlossen werden, da in HEK293 Zellen, die stabil TRPM3 exprimieren (HEK-M3-EYFP Zellen), nach Noradrenalin Applikation keine Reduktion der TRPM3-Aktivität beobachtet werden konnte (Abb. 4-2 D). Auch in Patch-Clamp Experimenten zeigt Noradrenalin einen starken und schnellen (innerhalb von ca. 1 s) inhibitorischen Effekt auf die durch PS hervorgerufenen Ein- und Auswärtsströme in primären  $\beta$ -Zellen und Ins1 Zellen (Abb. 4-3). In primären  $\beta$ -Zellen lag die gemittelte Inhibition der Einwärtsströme (bei -80 mV) bei etwa 93 % und die der Auswärtsströme (bei +80 mV)

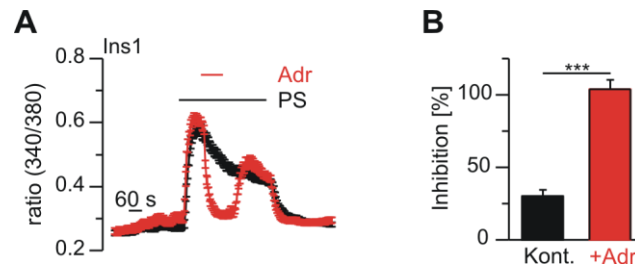


**Abbildung 4-3: Noradrenalin hemmt PS-induzierte Ströme schnell und reversibel in Ins1 Zellen und primären  $\beta$ -Zellen.** Gezeigt werden Whole-Cell Patch-Clamp Experimente mit primären  $\beta$ -Zellen und Ins1 Zellen. Ströme werden bei +80 mV und -80 mV gezeigt. (A, B) Beispielmessungen mit primären  $\beta$ -Zellen während Applikation von PS (50  $\mu$ M) und Co-Applikation von Noradrenalin (1  $\mu$ M). Es werden zwei Beispielmessungen gezeigt um zu verdeutlichen, dass die durch Noradrenalin induzierte TRPM3-Inhibition teilweise unterschiedlich stark ausgeprägt war. (C) Statistische Auswertung von Messungen, die wie A und B durchgeführt wurden (n=21; 5 Mäuse). Gezeigt wird der Strom während PS- (schwarzer Balken) bzw. PS- und Noradrenalin-Applikation (roter Balken), abzüglich des basalen Stroms vor PS-Applikation ( $\Delta$ Strom). Die in B gezeigten Pfeile kennzeichnen die Messpunkte. (D) Beispielmessung mit Ins1 Zellen, die vom Ablauf und dem experimentellem Design den Messungen mit primären  $\beta$ -Zellen entsprechen. Die Noradrenalkonzentration betrug jedoch nur 100 nM. (E) Statistik Auswertung von Experimenten, wie in D gezeigt (n=8). Darstellung und Auswertung entspricht der in C gezeigten Statistik.

bei etwa 70 % (Abb. 4-3 C). In Ins1 Zellen erreichte die gemittelte Inhibition der Einwärtsströme (bei -80 mV) etwa 87 % und die der Auswärtsströme (bei +80 mV) etwa 75 % und zeigte somit vergleichbare Werte (Abb. 4-3 E).

Abbildung 4-4 zeigt, dass auch Adrenalin in der Lage ist, die TRPM3-Aktivität in Ins1 Zellen zu inhibieren. Die Hemmung durch Adrenalin ist ebenfalls wie die Hemmung durch Noradrenalin schnell und reversibel (Abb. 4-4 A; rote Kurve). Die Kontrollmessungen ohne Adrenalin zeigen, dass der durch PS induzierte Anstieg des Fura-2-Signals nicht vollständig stabil ist und es nach einiger Zeit zu einer stetigen Erniedrigung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals kommt. Dieser Effekt zeigte sich immer bei Messungen mit Ins1 Zellen und längerer PS-Applikation. Das PS-Signal sinkt jedoch nicht wieder auf





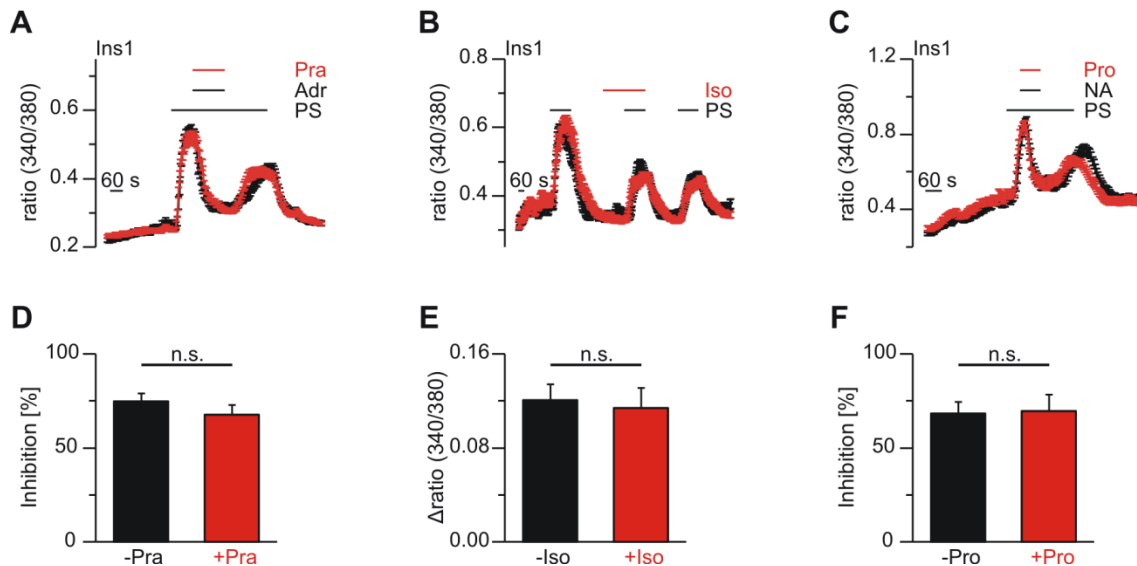
**Abbildung 4-4: Adrenalin hemmt ebenfalls die TRPM3-Aktivität.** (A) Verlauf des gemittelten Fura-2-Signals von Ins1 Zellen während alleiniger PS-Applikation (50 µM schwarze Kurve; n=38) bzw. Messungen, bei denen zum angegebenen Zeitpunkt noch Adrenalin (Adr; 2 µM) co-appliziert wurde (rote Kurve; n=37). (B) Statistische Auswertung zu den in A gezeigten Experimenten. Die gemittelte Inhibition errechnet sich aus dem Fura-2-Signal während der Adrenalin-Applikation im Verhältnis zum Signal während der ersten, alleinigen PS-Applikation, abzüglich des basalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals vor PS-Stimulation. Die Inhibition wurde für jede Zelle einzeln errechnet und anschließend wurden die Werte gemittelt.

Basalniveau herab, sondern nach einiger Zeit verbleibt das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal auf einem relativ stabilen Wert. Diese Erniedrigung des Fura-2-Signals ist die Erklärung für die ca. 25% Inhibition der anfänglichen PS-Antwort bei den Kontrollmessungen (Abb. 4-4 B).

### 4.3 Die Inhibierung von TRPM3 durch Noradrenalin wird über $\alpha_2$ -Adrenorezeptoren vermittelt

Adrenalin und Noradrenalin vermitteln alle ihre bekannten Wirkungen durch Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Adrenorezeptoren. Da eine direkte Interaktion von Noradrenalin mit TRPM3 ausgeschlossen werden konnte (Abb. 4-2 D), lag die Vermutung nahe, dass der inhibitorische Effekt ebenfalls auf eine Aktivierung von Adrenorezeptoren zurückzuführen ist.

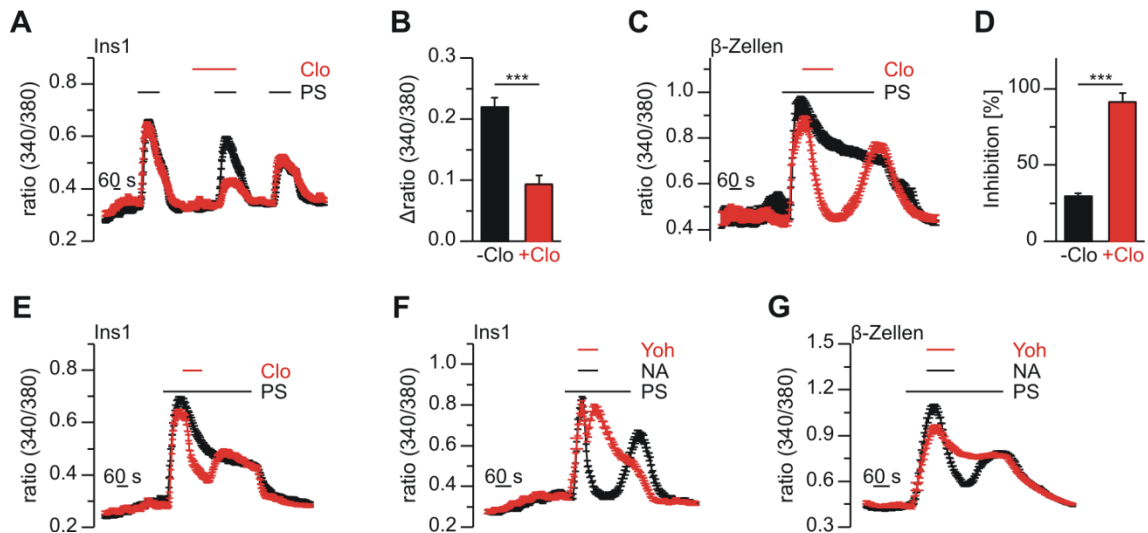
In  $\beta$ -Zellen sind vor allem  $\alpha_2$ - und  $\beta_2$ -Adrenorezeptoren relevant, da gezeigt werden konnte, dass sie die Insulinfreisetzung modulieren [Santulli et al. 2012; Straub & Sharp 2012]. Es gibt jedoch auch Hinweise, dass andere ( $\alpha_1$  und  $\beta_1$ ) Adrenorezeptoren in  $\beta$ -Zellen exprimiert werden [Kutlu et al. 2009]. Um zu klären, welcher Adrenorezeptor-Typ für die TRPM3-Hemmung verantwortlich ist, wurden pharmakologische Untersuchungen mit verschiedenen selektiven Adrenorezeptoragonisten und Antagonisten vorgenommen. Verwendet wurden: Propranolol als  $\beta$ -Adrenorezeptor Antagonist ( $\beta_1$  und  $\beta_2$ ), Isoproterenol als  $\beta$ -Adrenorezeptor Agonist ( $\beta_1$  und  $\beta_2$ ), Prazosin als selektiver  $\alpha_1$ -Adrenorezeptor Antagonist, Clonidin als selektiver  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor Agonist und



**Abbildung 4-5: Die Hemmung der TRPM3-Aktivität durch Noradrenalin wird nicht über  $\alpha_1$ -,  $\beta_1$ - oder  $\beta_2$ -Adrenorezeptoren vermittelt.** Die Kurven repräsentieren den gemittelten Verlauf des Fura-2-Signals in Ins1 Zellen. Die schwarzen Kurven stellen die Kontrollmessungen ohne Applikation des entsprechenden Adrenorezeptor Agonisten oder Antagonisten dar. In allen Messungen wurde 50  $\mu$ M PS verwendet, um TRPM3-Kanäle zu aktivieren. **(A)** Messungen mit Co-Applikation von Prazosin (Pra; 2  $\mu$ M): n=56. Messungen ohne Prazosin: n=38. Die Adrenalinkonzentration betrug in allen Messungen 2  $\mu$ M. **(B)** Messungen mit Applikation von Isoproterenol (Iso; 10  $\mu$ M): n=57. Messungen ohne Isoproterenol: n=38. **(C)** Messungen mit Co-Applikation von Propranolol (Pro; 20  $\mu$ M): n=76. Messungen ohne Propranolol: n=75. Die Noradrenalinkonzentration betrug in allen Messungen 100 nM **(D, E, F)** Statistische Auswertung der Messungen aus A, B und C. Die Inhibition von D und F wurde berechnet, wie in Abb. 4-4 B beschrieben. In E werden die gemittelten Werte bei der zweiten PS-Applikation, abzüglich des basalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Wertes vor dieser Applikation, dargestellt.

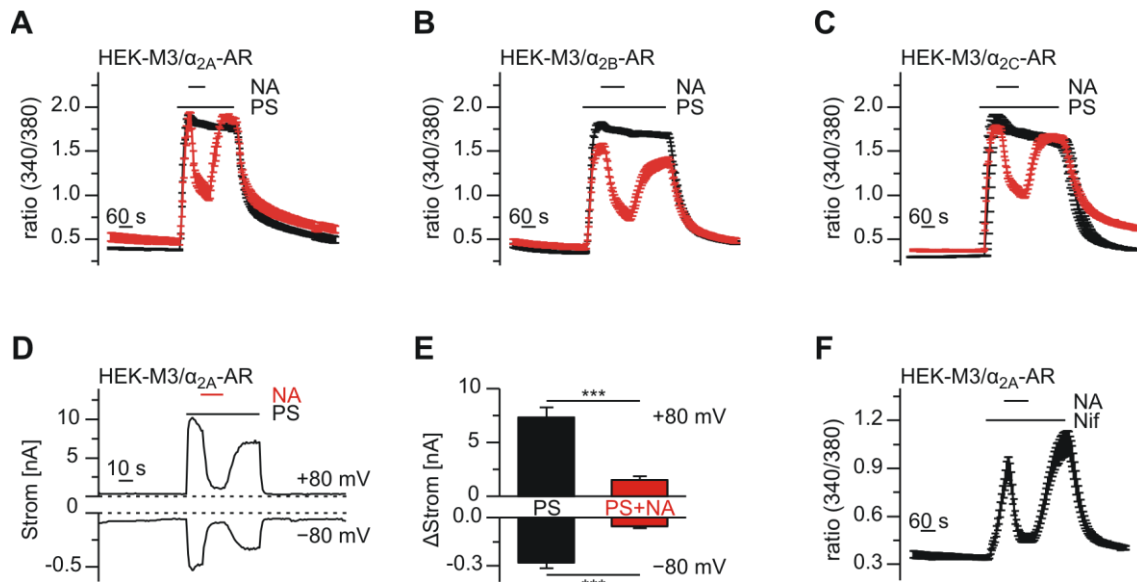
Yohimbin als selektiver  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor Antagonist [Aktories et al. 2005; Schmitz & Holzgrabe 2011; Starke 2011] (Abb. 4-5 und 4-6).

Aus Abbildung 4-5 A und D ist ersichtlich, dass Prazosin und somit eine Hemmung der  $\alpha_1$ -Adrenorezeptoren (rote Kurve) die Inhibierung der TRPM3-Aktivität durch Adrenalin, im Vergleich zu Kontrollmessungen ohne Prazosin (schwarze Kurve), weder aufhebt noch abschwächt. Somit kann eine Rolle der  $\alpha_1$ -Adrenorezeptoren bei der Inhibierung von TRPM3 ausgeschlossen werden. Auch eine unselektive Aktivierung von  $\beta$ -Adrenorezeptoren durch Isoproterenol konnte keine Reduktion der TRPM3-Aktivität herbeiführen (Abb. 4-5 B und E). Ebenso konnte eine Hemmung von  $\beta$ -Adrenorezeptoren die durch Noradrenalin induzierte Inhibierung von TRPM3-Kanälen nicht abschwächen (Abb. 4-5 C und F). Eine Beteiligung von  $\beta$ -Adrenorezeptoren an der Inhibition von TRPM3-Kanälen kann folglich ebenfalls ausgeschlossen werden. Eine



**Abbildung 4-6: Die durch Noradrenalin induzierte TRPM3-Hemmung wird über  $\alpha_2$ -Adrenorezeptoren vermittelt.**  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging Experimente mit dem  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor Agonisten Clonidin (Clo) bzw. dem Antagonisten Yohimbin (Yoh). Die Experimente wurden in Ins1 Zellen und primären  $\beta$ -Zellen durchgeführt. In allen Messungen wurde zu den angegebenen Zeitpunkten 50  $\mu\text{M}$  PS appliziert. Die schwarzen Kurven bzw. Balken repräsentieren jeweils die Kontrollmessungen. Rote Kurven bzw. Balken zeigen Messungen mit zusätzlicher Clonidin- bzw. Yohimbin-Applikation. **(A)** Kontrolle: n=75, mit Clonidin (1  $\mu\text{M}$ ): n=76. **(B)** Statistik zu A: zeigt die gemittelten Werte des zweiten PS-Stimulus abzüglich des basalen Fura-2-Signals vor dieser Applikation ( $\Delta\text{ratio (340/380)}$ ). **(C)** Kontrolle: n=32, mit Clonidin (1  $\mu\text{M}$ ): n=43. **(D)** Statistik zu C. **(E)** Kontrolle: n=57, mit Clonidin (50 nM): n=55. **(F)** Kontrolle: n=95, mit Yohimbin (20  $\mu\text{M}$ ) n=114. **(G)** Kontrolle: n= 116, mit Yohimbin (20  $\mu\text{M}$ ) n=149. In F und G betrug die Noradrenalinkonzentration 100 nM.

selektive Aktivierung von  $\alpha_2$ -Adrenorezeptoren durch Clonidin (1  $\mu\text{M}$ ) hingegen zeigte sowohl in Ins1 als auch in primären  $\beta$ -Zellen eine starke und signifikante Reduktion des TRPM3-Signals (Abb. 4-6 A, B, C und D). Selbst niedrige Konzentrationen von Clonidin (50 nM) riefen noch eine deutliche Reduktion der PS-Antwort in Ins1 Zellen hervor (Abb. 4-6 E). Eine Hemmung von  $\alpha_2$ -Adrenorezeptoren durch Yohimbin führte zu einer nahezu vollständigen Aufhebung der durch Noradrenalin ausgelösten TRPM3-Inhibition, sowohl in Ins1 Zellen als auch in primären  $\beta$ -Zellen (Abb. 4-6 D und E). Folglich scheint die Inhibition von TRPM3 durch Noradrenalin über  $\alpha_2$ -Adrenorezeptoren vermittelt zu werden. In Ins1 Zellen zeigte sich bei Co-Applikation von Noradrenalin und Yohimbin zunächst eine kurze, aber nicht anhaltende TRPM3-Inhibition zu Beginn der Co-Applikation. Dies ist womöglich darauf zurückzuführen, dass Noradrenalin den  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor schneller zu aktivieren vermag, als Yohimbin



**Abbildung 4-7:** Im heterologen Überexpressionssystem kann der Signalweg, der zur Hemmung von TRPM3 führt, rekonstruiert werden. Alle Isoformen des  $\alpha_2$ -Adrenorezeptors sind in der Lage, eine Inhibition der TRPM3-Aktivität zu vermitteln. Auch die durch Nifedipin stimulierte TRPM3-Aktivität wird durch Noradrenalin inhibiert. HEK293 Zellen, die stabil TRPM3 exprimieren (HEK-M3), wurden mit verschiedenen Isoformen des  $\alpha_2$ -Adrenorezeptors transient transfiziert und in  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging (A-C, F) und Patch-Clamp Experimenten (D und E) untersucht. Substanzen wurden in folgenden Konzentrationen appliziert: 50  $\mu\text{M}$  PS (A-E); 100 nM (A-E) bzw 1  $\mu\text{M}$  (F) Noradrenalin; 50  $\mu\text{M}$  Nifedipin (Nif, F). Die roten Kurven zeigen das gemittelte Fura-2-Signal von transfizierten Zellen und die schwarzen Kurven von untransfizierten Kontrollzellen (A-C). **(A)** Transfiziert mit  $\alpha_{2A}$ -Adrenorezeptor: n=15; Kontrollen: n=45. **(B)**  $\alpha_{2B}$ -Adrenorezeptor: n=57; Kontrollen: n=47. **(C)** Transfiziert mit  $\alpha_{2C}$ -Adrenorezeptor: n=71; Kontrollen: n=48. **(D)** Beispielmessung von HEK-M3 Zellen transient transfiziert mit  $\alpha_{2A}$ -Adrenorezeptor. **(E)** Statistische Auswertung von Messungen wie in D gezeigt. Vom gemessenen Strom während PS- bzw. PS- und Noradrenalin-Applikation wurde der Basisstrom vor Applikationsbeginn abgezogen ( $\Delta$ Strom) und die erhaltenen Werte gemittelt (n=10). **(F)** Transfiziert mit  $\alpha_{2A}$ -Adrenorezeptor: n=47.

den Rezeptor inhibiert. Diese transiente Inhibition konnte jedoch bei vergleichbaren Messungen mit primären  $\beta$ -Zellen nicht beobachtet werden.

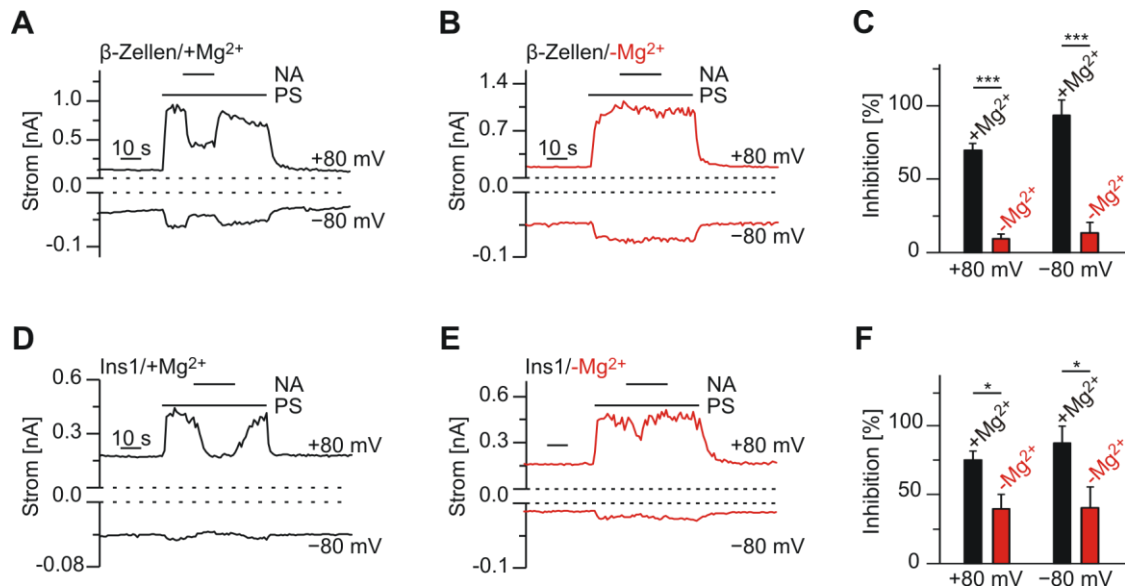
Um die Ergebnisse aus den pharmakologischen Untersuchungen zu verifizieren und zu untersuchen, ob der Signalweg auch im heterologen Überexpressionssystem rekonstruiert werden kann, wurden  $\alpha_2$ -Adrenorezeptoren in HEK293 Zellen, die stabil TRPM3 exprimieren (HEK-M3 Zellen), transient exprimiert. In  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging Experimenten zeigten alle drei  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor-Isoformen ( $\alpha_{2A}$ -AR,  $\alpha_{2B}$ -AR und  $\alpha_{2C}$ -AR) die Fähigkeit, die durch Noradrenalin induzierte TRPM3-Inhibition zu vermitteln (Abb. 4-7 A, B und C, rote Kurven). Die Inhibition war jedoch etwas schwächer als in Ins1 oder primären  $\beta$ -Zellen. In untransfizierten Kontrollzellen konnte nach

Noradrenalin-Applikation keine Reduktion der TRPM3-Aktivität beobachtet werden (Abb. 4-7 A, B und C, schwarze Kurven). In Patch-Clamp Messungen zeigten mit  $\alpha_{2A}$ -Adrenorezeptor transfizierte HEK-M3 Zellen eine starke und signifikante Reduktion der Einwärts- und Auswärtsströme nach Applikation von Noradrenalin (Abb. 4-7 D und E). Weiterhin wurde untersucht, ob  $\alpha_2$ -Adrenorezeptoren auch die durch Nifedipin induzierte TRPM3-Aktivität inhibieren kann. Abbildung 4-7 F zeigt, dass dies der Fall ist. Zusammenfassend kann aus den in Abbildung 4-5, 4-6 und 4-7 präsentierten Daten gefolgert werden, dass Noradrenalin mittels Aktivierung von  $\alpha_2$ -Adrenorezeptoren die Hemmung der TRPM3-Kanäle vermittelt und der Signalweg im heterologen Überexpressionssystem rekonstruiert werden kann.

#### **4.4 Dem Noradrenalin-Effekt liegt ein $G\alpha_i/G\alpha_o$ -gekoppelter Signalweg zugrunde**

Wie bereits beschrieben, handelt es sich bei  $\alpha_2$ -Adrenorezeptoren um  $G\alpha_i/G\alpha_o$ -gekoppelte GPCR. Somit stellte sich die Frage, ob die  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor vermittelte Hemmung von TRPM3 auch über einen  $G\alpha_i/G\alpha_o$ -gekoppelten Signalweg transduziert wird.

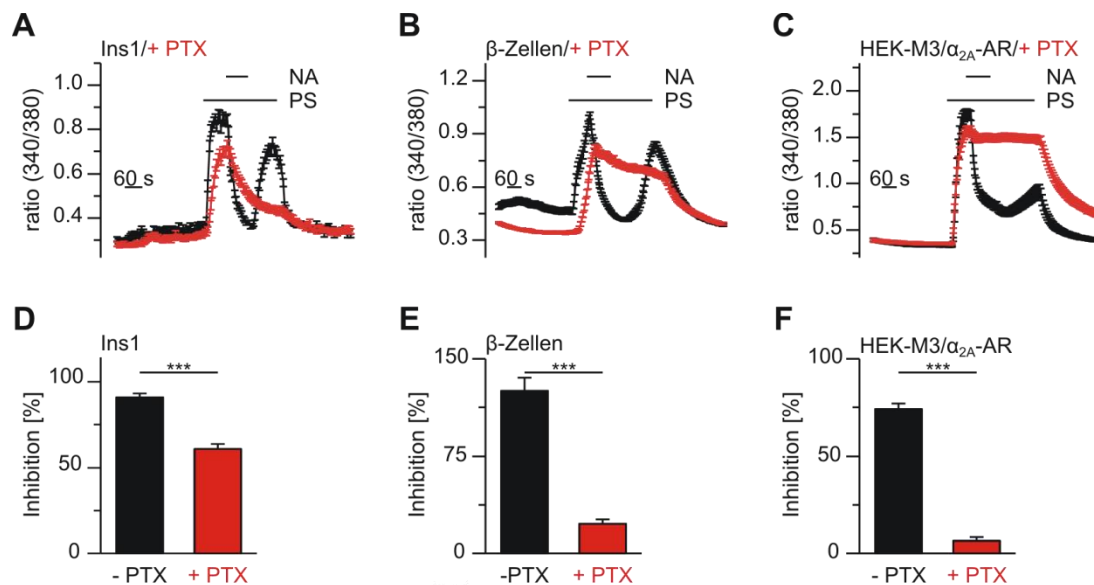
Um zunächst zu klären, ob generell G-Proteine an der Inhibition beteiligt sind (und um die Experimente mit GTPyS aus Abbildung 4-1 zu bestätigen), wurden Patch-Clamp Experimente in der Whole-Cell-Konfiguration mit einer  $Mg^{2+}$ -freien Intrazellulärlösung in Ins1 und  $\beta$ -Zellen durchgeführt.  $Mg^{2+}$  ist notwendig für den Austausch von GDP und GTP und somit für die Funktion von G-Proteinen unerlässlich [Gilman 1987]. Abbildung 4-8 zeigt, dass unter Verwendung der  $Mg^{2+}$ -freien Intrazellulärlösung die durch Noradrenalin vermittelte Inhibition von TRPM3 drastisch reduziert wurde. In manchen Messungen (siehe Beispielkurven 4-8 B und E) konnte sogar keine Inhibierung der Kanal-Aktivität mehr beobachtet werden. Die Reduktion der Inhibition fällt bei den primären  $\beta$ -Zellen stärker aus als in Ins1 Zellen. Dies kann damit begründet werden, dass die  $\beta$ -Zellen eine sphärische Form besitzen, die einen schnellen Austausch der löslichen, cytosolischen Komponenten begünstigt. Ins1 Zellen hingegen sind morphologisch komplexer und somit ist von einem langsameren Lösungsaustausch auszugehen. Damit steigt auch die Wahrscheinlichkeit, dass in der gegebenen Zeit kein vollständiger Lösungsaustausch stattfindet und  $Mg^{2+}$ -Restkonzentrationen in der Zelle



**Abbildung 4-8: Intrazelluläres  $Mg^{2+}$  ist essentiell für die durch Noradrenalin vermittelte Inhibition der TRPM3-Aktivität. Dies spricht für eine Beteiligung von G-Proteinen, die für eine korrekte Funktion  $Mg^{2+}$  benötigen.** Whole-Cell Patch-Clamp Experimente mit primären  $\beta$ -Zellen und Ins1 Zellen. Die PS-Konzentration betrug 50  $\mu M$ , die Noradrenalkonzentration 1  $\mu M$  (primäre  $\beta$ -Zellen) bzw. 100 nM (Ins1 Zellen). Die Zeit zwischen Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration und dem Start der Messungen betrug 60-90 Sekunden. (A, B, D, E) Beispielmessungen mit (A, D) und ohne  $Mg^{2+}$  (B, E) in der Pipettenlösung. (C, F) Statistische Auswertung von Messungen wie in A und B (C;  $+Mg^{2+}$ :  $n=21$ ;  $-Mg^{2+}$ :  $n=10$ ) bzw. in D und E (F;  $+Mg^{2+}$ :  $n=8$ ;  $-Mg^{2+}$ :  $n=6$ ) gezeigt.

verbleiben. Außerdem lag der gemittelte Serienwiderstand bei den Messungen (ohne  $Mg^{2+}$ ) mit den primären  $\beta$ -Zellen ( $5,3 \pm 0,23 \text{ M}\Omega$ ) niedriger als bei den Messungen mit Ins1 Zellen ( $6,64 \pm 0,96 \text{ M}\Omega$ ).

Um nun zu klären, ob die Inhibition über einen  $G_{\alpha_i}$ -,  $G_{\alpha_o}$ -gekoppelten Signalweg vermittelt wird, wurden  $Ca^{2+}$ -Imaging-Experimente mit Zellen durchgeführt, die zuvor mit Pertussis Toxin (PTX) präinkubiert wurden. Bei PTX handelt es sich um ein Exotoxin, das von *Bordetella pertussis* sekretiert wird. Das Toxin bindet an glykosylierte Membranproteine auf der Membranoberfläche von Säugerzellen und wird daraufhin durch Endocytose aufgenommen. Über retrograden Transport gelangt PTX letztendlich ins Cytosol, wo es zelluläres NAD hydrolysiert und die freigewordene ADP-Ribose auf  $G\alpha$ -Untereinheiten der  $G_i$ - und  $G_o$ -Familie überträgt. Diese Modifikation der  $G\alpha$ -Untereinheit verhindert eine Interaktion mit den entsprechenden GPCR, so dass alle  $G_i$ - und  $G_o$ -gekoppelten Signalwege ausgeschaltet werden.  $G_q$ - und  $G_s$ -gekoppelte Signalwege werden jedoch nicht gestört [Carbonetti 2010]. Die Experimente mit PTX wurden in Ins1 Zellen, primären  $\beta$ -Zellen und im heterologen Überexpressionssystem

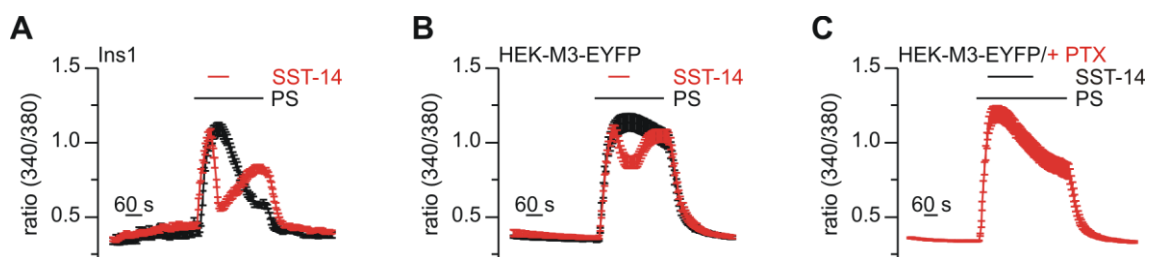


**Abbildung 4-9: In Zellen, die mit Pertussis Toxin (PTX) behandelt wurden, kann Noradrenalin die TRPM3-Aktivität nicht mehr inhibieren.** Ca<sup>2+</sup>-Imaging Experimente wurden mit Ins1 Zellen, primären β-Zellen und mit HEK-M3 Zellen, die transient mit dem α<sub>2A</sub>-Adrenorezeptor transfiziert wurden, durchgeführt. Rote Kurven zeigen Zellen, die mit 100 ng/ml PTX für mindestens 16 h behandelt wurden (PTX wurde dem Kulturmedium beigegeben und die Zellen die angegebene Zeit bis zur Messung im Inkubator gelagert), unbehandelte Kontrollzellen werden in schwarz dargestellt. In allen Messungen wurde 50 μM PS und 100 nM Noradrenalin appliziert. (A) Mit PTX: n=67; Ohne PTX: n=49. (B) Mit PTX: n=100; Ohne PTX: n=111. (C) Mit PTX: n=63; Ohne PTX: n=31. (D, E, F) Statistische Auswertung der in A-C gezeigten Experimente. Verglichen wurde die Inhibition während Noradrenalin-Applikation zwischen PTX behandelten und unbehandelten Zellen.

(HEK-M3 Zellen transient mit α<sub>2A</sub>-Adrenorezeptor transfiziert) durchgeführt (Abb. 4-9). In allen Modellen zeigten die mit PTX behandelten Zellen (rote Kurven bzw. Balken) eine deutliche bzw. vollständige Aufhebung der TRPM3-Inhibition, bedingt durch die Applikation von Noradrenalin. Bei den Experimenten mit Ins1 Zellen ist zwar auch bei vorheriger Behandlung mit PTX eine Abnahme der TRPM3-Aktivität zu beobachten, diese Abnahme ist aber bei Ins1 Zellen und einer längeren PS-Applikation immer zu beobachten (siehe Abb. 4-4 A und 4-10 A jeweils die schwarze Kurve). Zellen, die nicht mit PTX behandelt wurden (schwarze Kurven), zeigten hingegen eine starke Inhibition des TRPM3-Signals. Dies lässt darauf schließen, dass der Inhibition von TRPM3 nach Aktivierung von α<sub>2</sub>-Adrenorezeptoren ein G<sub>i</sub>- bzw. G<sub>o</sub>-gekoppelter Signalweg zugrunde liegt.

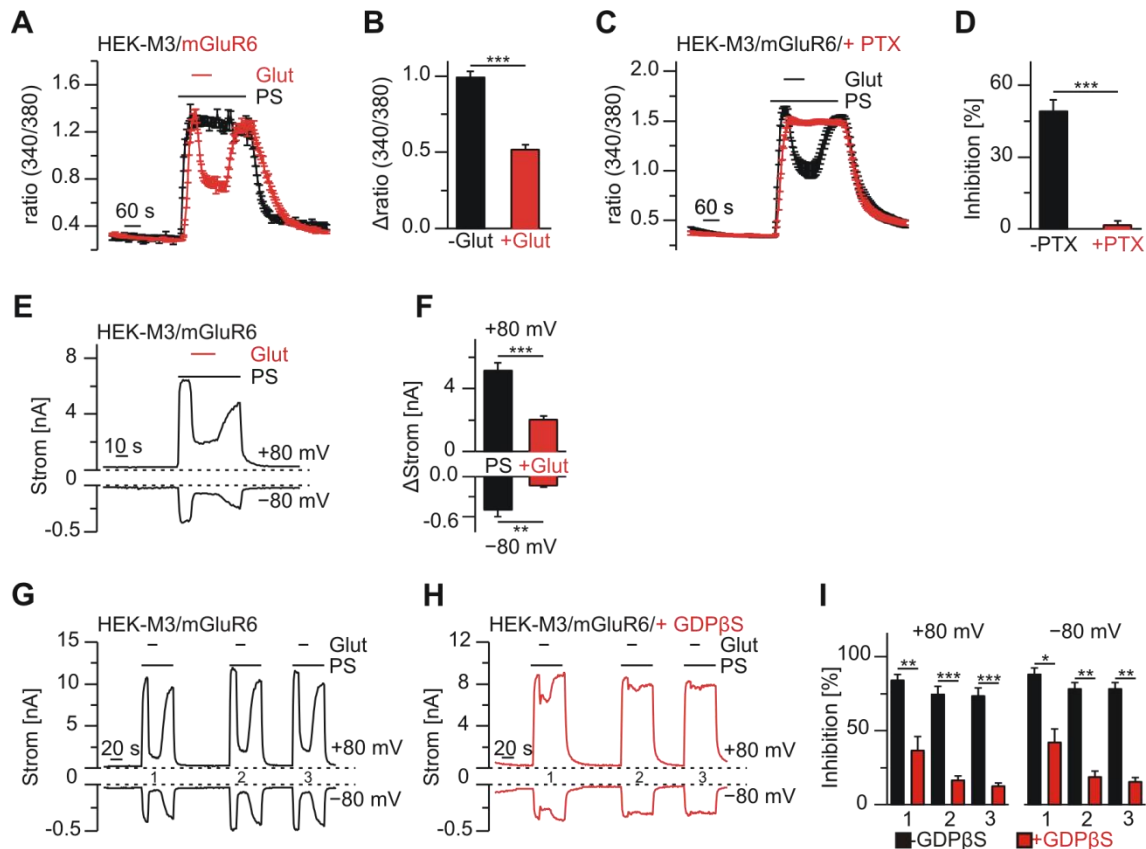
#### 4.5 Auch andere $G\alpha_i$ -, $G\alpha_o$ -gekoppelte GPCR sind in der Lage, eine Inhibition der TRPM3-Aktivität zu vermitteln.

Es drängte sich die Frage auf, ob die Hemmung von TRPM3 nur über  $\alpha_2$ -Adrenorezeptoren vermittelt werden kann oder ob auch andere  $G_i$ - bzw.  $G_o$ -gekoppelte GPCR in der Lage sind, eine Inhibition von TRPM3 herbeizuführen. In humanen  $\beta$ -Zellen werden neben vielen weiteren GPCR auch Somatostatin-Rezeptoren ( $SSTR_1$ - $SSTR_5$ ) exprimiert [Portela-Gomes et al. 2000]. Es ist bekannt, dass Somatostatin (wie Noradrenalin) die Sekretion von Insulin hemmen kann und dies wahrscheinlich über  $SSTR_2$  und  $SSTR_5$  vermittelt wird [Strowski et al. 2000; Winzell & Ahrén 2007; Mergler et al. 2008]. Der  $SSTR_2$ -Subtyp ist wie der  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor ein  $G\alpha_i$ -,  $G\alpha_o$ -gekoppelter Rezeptor und seine Expression konnte in Ins1 Zellen und HEK293 Zellen gezeigt werden [Law et al. 1993; Mergler et al. 2008]. In den durchgeführten  $Ca^{2+}$ -Imaging Experimenten wurde TRPM3 mit PS aktiviert und dann der SSTR-Agonist Somatostatin-14 coappliziert. Rote Kurven stellen Messungen mit Somatostatin-14 Co-Applikation dar, schwarze Kurven hingegen Messungen, in denen nur PS appliziert wurde (Abb. 10 A und B). In Ins1 Zellen kam es zu einer starken und reversiblen Reduktion der TRPM3-Aktivität nach Applikation des SSTR-Agonisten. Anzumerken ist, dass noch während der Somatostatin-14-Applikation das TRPM3-Signal bereits wieder anfang zu steigen (Abb. 4-10 A). Dies wurde bei Experimenten mit Noradrenalin nie beobachtet. Erst nach Auswaschen des Katecholamins stieg hier die TRPM3-Aktivität wieder an. In HEK-M3-EYFP Zellen bewirkte die Aktivierung von SSTR ebenfalls eine



**Abbildung 4-10: Aktivierung von endogenen Somatostatinrezeptoren induziert ebenfalls eine Inhibition der TRPM3-Aktivität über einen PTX sensitiven Signalweg.**  $Ca^{2+}$ -Imaging Experimente wurden mit Ins1 und HEK-M3-EYFP Zellen durchgeführt. Rote Kurven zeigen Messungen, bei denen 500 nM Somatostatin-14 (SST-14) appliziert wurde. In allen Messungen wurde 50  $\mu$ M PS verwendet. (A) Ins1 Zellen mit Somatostatin-14: n=57; Kontrollen: n=19. (B) HEK-M3-EYFP Zellen mit Somatostatin-14: n=54; Kontrollen: n=30. (C) HEK-M3-EYFP Zellen (n=57) wurden für mindestens 16 h mit 100 ng/ml PTX behandelt, bevor sie mit PS und SST-14 getestet wurden.





**Abbildung 4-11: Aktivierung des GPCR mGluR6 führt zu einer Inhibition der TRPM3-Aktivität, über einen G-Protein abhängigen und PTX-sensitiven Signalweg.** Die Wirkung von mGluR6 auf TRPM3 wurde sowohl mittels  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging Experimenten (A-D) als auch Whole-Cell Patch-Clamp Experimenten (E-I) untersucht. Dafür wurden HEK-M3 Zellen transient mit mGluR6 transfiziert. Die Glutamatkonzentration (Glut) betrug immer 1 mM, die PS-Konzentration 50  $\mu\text{M}$ . **(A)** Die rote Kurve zeigt Messungen, bei denen Glutamat co-appliziert wurde ( $n=38$ ), die Schwarze ohne Glutamatapplikation ( $n=19$ ). **(B)** Statistische Auswertung zu den in A gezeigten Messungen. **(C)** Die rote Kurve zeigt Zellen, die für mindestens 16 h mit 100 ng/ml PTX behandelt wurden ( $n=30$ ). In schwarz sind die unbehandelten Zellen dargestellt ( $n=18$ ). **(D)** Statistik zu C. **(E)** Elektrophysiologische Beispielmessung mit Glutamat-Applikation. **(F)** Statistische Auswertung von Messungen, wie in E gezeigt ( $n=7$ ). Der gemittelte Serienwiderstand betrug  $6,27 \pm 1,09 \text{ M}\Omega$ . **(G, H)** Beispielmessungen mit (H) und ohne (G) 400  $\mu\text{M}$  GDP $\beta\text{S}$  in der Pipettenlösung. Die Applikation von Glutamat und PS war in den Messungen identisch. **(I)** Statistik zu Messungen wie in G und H durchgeführt (mit GDP $\beta\text{S}$ :  $n=6$ , gemittelter Serienwiderstand= $4,91 \pm 0,36 \text{ M}\Omega$ ; ohne GDP $\beta\text{S}$ :  $n=6$ , gemittelter Serienwiderstand= $5,8 \pm 0,4 \text{ M}\Omega$  (kein signifikanter Unterschied). Die Zahlen symbolisieren die drei Applikationsblöcke.

Abnahme der TRPM3-Aktivität, jedoch war die Inhibierung deutlich schwächer ausgeprägt. Während der Somatostatin-14-Applikation bleibt die Inhibition jedoch konstant und erst nach Auswaschen der Substanz stieg das PS-Signal erneut (Abb. 4-10 B). Abbildung 10 C zeigt, dass der inhibitorische Somatostatin-Effekt in HEK-M3-EYFP

Zellen ebenfalls PTX-sensitiv ist und somit ein  $G\alpha_i$ - bzw.  $G\alpha_o$ -gekoppelter Signalweg zugrunde liegt.

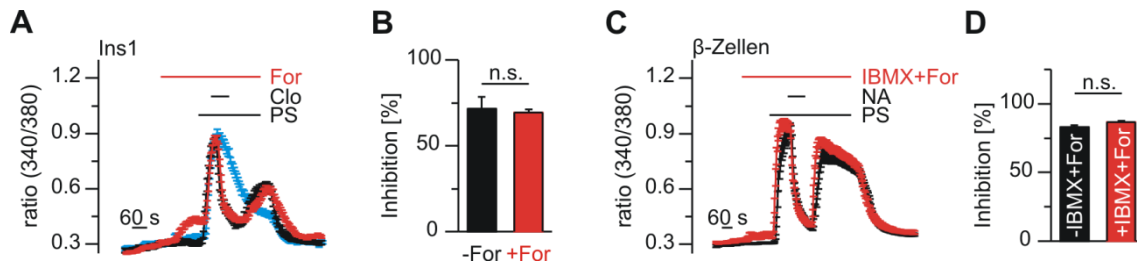
Der GPCR mGluR6 ist ein  $G\alpha_o$ -gekoppelter GPCR, der endogen weder in  $\beta$ -Zellen, noch in HEK293 Zellen vorkommt [Beqollari et al. 2009; Koike et al. 2010; Atwood et al. 2011; Vardi et al. 2011]. In  $Ca^{2+}$ -Imaging Experimenten zeigte sich jedoch, dass HEK-M3 Zellen, die mit mGluR6 transient transfiziert wurden, nach Glutamat-Applikation eine deutliche und stabile Inhibition der TRPM3-Aktivität aufweisen (Abb. 4-11 A und B).  $Ca^{2+}$ -Imaging Experimente mit PTX-behandelten Zellen (Abb. 4-11 C und D, rote Kurve bzw. roter Balken) zeigen außerdem, dass die TRPM3-Hemmung durch mGluR6 auch durch einen  $G\alpha_i$ - bzw.  $G\alpha_o$ -gekoppelten Signalweg vermittelt wird.

Der inhibitorische Effekt konnte in Patch-Clamp Messungen bestätigt werden. Eine Aktivierung von mGluR6 durch Glutamat führte zu einer signifikanten Hemmung von PS-induzierten Ein- und Auswärtsströmen (Abb. 4-11 E und F). Während der Messungen wurde eine  $Mg^{2+}$ -freie Intrazellulärlösung verwendet, die, wie in Abbildung 4-8 gezeigt, eigentlich die Aktivität von G-Proteinen deutlich reduzieren sollte. Dennoch war eine starke und stabile Inhibition der TRPM3-Ströme zu beobachten, die selbst nach mehreren Minuten noch induziert werden konnte (Abb. 4-11 G). Der Grund hierfür ist völlig unklar. Die mGluR6-vermittelte Inhibition konnte jedoch mit dem unspezifischen G-Protein-Inhibitor GDP $\beta$ S (in der Intrazellulärlösung) aufgehoben werden (Abb. 4-11 H und I). Die G-Protein Hemmung durch GDP $\beta$ S führte zu einer signifikanten und fast vollständigen Reduktion der mGluR6-bedingten TRPM3-Inhibition. Dies bestätigt, dass die mGluR6-vermittelte TRPM3-Inhibition durch einen G-Protein-abhängigen Signalweg induziert wird. Der gemittelte Serienwiderstand lag zwar bei den Messungen ohne GDP $\beta$ S ( $5,8 \pm 0,4 \text{ M}\Omega$ ) etwas höher als bei den Messungen mit GDP $\beta$ S ( $4,91 \pm 0,36 \text{ M}\Omega$ ), dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant. Da in der Pipettenlösung befindliches GDP $\beta$ S in der Lage war, die Inhibition aufzuheben, spricht dies dafür, dass es zu einem Austausch von Cytosol und Pipettenlösung gekommen ist. Bei den Messungen mit Ins1 Zellen ohne  $Mg^{2+}$  in der Pipettenlösung (Abb. 4-8 E und F) betrug der gemittelte Serienwiderstand  $6,64 \pm 0,96 \text{ M}\Omega$  und lag somit höher. Bei diesen Messungen zeigte sich jedoch bei Abwesenheit von intrazellulärem  $Mg^{2+}$  eine signifikante Reduktion der TRPM3-Inhibition. Warum die Abwesenheit von  $Mg^{2+}$  nicht auch die mGluR6-vermittelte TRPM3-Hemmung

abschwächt, ist äußerst faszinierend, wurde aber nicht näher untersucht. Es kann natürlich nicht ausgeschlossen werden, dass während der Messungen noch genügend  $Mg^{2+}$  in der Zelle verblieb, um die korrekte Funktion der G-Proteine zu gewährleisten. Trotz alledem zeigen die Experimente mit SSTR und mGluR6, dass die TRPM3-Inhibition kein exklusiver Effekt ist, der nur von  $\alpha_2$ -Adrenorezeptoren vermittelt werden kann, sondern auch andere  $G\alpha_i$ - bzw.  $G\alpha_o$ -gekoppelte GPCR in der Lage sind, eine TRPM3-Hemmung zu induzieren.

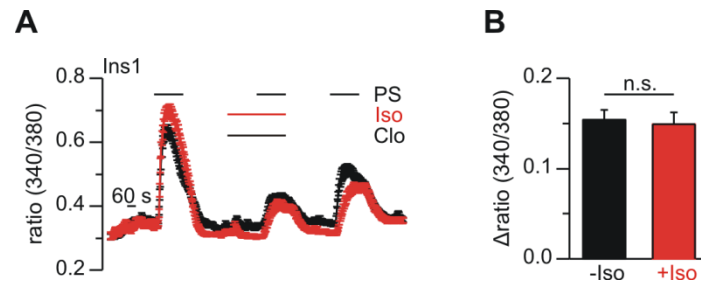
#### **4.6 Die Inhibierung von TRPM3 wird nicht über den „klassischen“ $G\alpha_i$ -Signalweg vermittelt**

Unter dem „klassischen“  $G\alpha_i$ - bzw.  $G\alpha_o$ -Signalweg versteht man eine Hemmung der Adenylatcyclase nach Aktivierung eines  $G_i$ -gekoppelten Rezeptors und die daraus resultierende sinkende Konzentration des „second Messengers“ cAMP im Cytosol, gefolgt von u. a. einer Verminderung der PKA-Aktivität. Es ist somit denkbar, dass die TRPM3-Inhibition durch eine Erniedrigung des cAMP-Spiegels eingeleitet wird. Ist dies der Fall, so sollte eine künstliche Erhöhung der cAMP-Konzentration die durch Aktivierung von  $\alpha_2$ -Adrenorezeptoren herbeigeführte TRPM3-Hemmung aufheben oder deutlich abschwächen. Im Folgenden wurden deshalb  $Ca^{2+}$ -Imaging Experimente mit Forskolin, einem Adenylatcyclase Aktivator, und IBMX, einem Phosphodiesterase Inhibitor, durchgeführt [Beavo et al. 1970, Hanoune & Defer 2001; Bavencoffe et al. 2010]. Beide Substanzen führen zu einer cytosolischen Erhöhung des cAMP-Spiegels: Forskolin, indem es durch Anregung der Adenylatcyclase die Bildung von cAMP fördert, und IBMX, indem es den cAMP-Abbau hemmt. Abbildung 4-12 A und B zeigt, dass in Ins1 Zellen die Applikation von Forskolin die  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor vermittelte TRPM3-Inhibition nicht abschwächt (rote Kurve bzw. roter Balken), sondern die Inhibition im gleichen Maße ausgeprägt ist wie in Zellen ohne Forskolin-Applikation (schwarze Kurve bzw. schwarzer Balken). Ein ähnliches Bild zeigte sich in primären  $\beta$ -Zellen (Abb. 4-12 C und D). Bei diesen Messungen wurde Forskolin zusammen mit IBMX appliziert, um eine besonders starke Erhöhung der cAMP-Konzentration zu erreichen (rote Kurve bzw. roter Balken). Auch hier konnte kein Unterschied zwischen Kontrollmessungen (schwarze Kurve bzw. schwarzer Balken) und Forskolin-/IBMX-behandelten Zellen festgestellt werden. Zu erwähnen bleibt, dass Forskolin bzw. Forskolin und IBMX einen



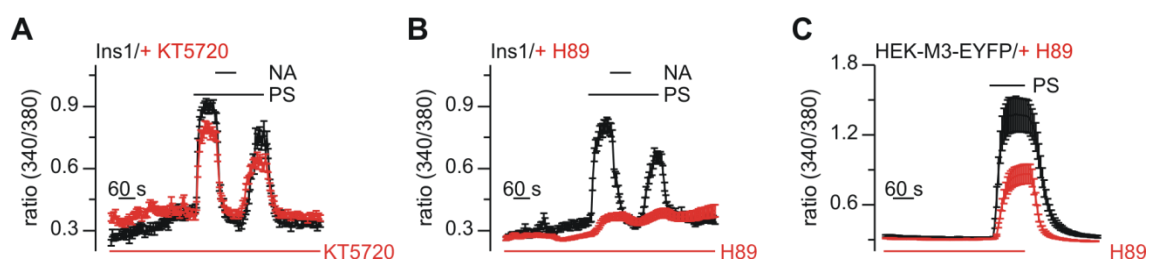
**Abbildung 4-12: Erhöhung der cytosolischen cAMP-Konzentration mittels Forskolin und IBMX kann den Noradrenalin Effekt nicht abschwächen.** Ca<sup>2+</sup>-Imaging Experimente wurden mit Ins1 Zellen und primären β-Zellen durchgeführt. Die schwarzen Kurven stellen Kontrollmessungen dar, bei denen nur PS (50 µM) und Noradrenalin (100 nM) bzw. Clonidin (Clo; 1 µM) appliziert wurde. Bei den in Rot gezeigten Messungen wurde zusätzlich noch Forskolin (For; 10 µM) bzw. Forskolin (For; 10 µM) und IBMX (200 µM) co-appliziert. **(A)** Mit Forskolin: n=149; Ohne Forskolin: n=54. Die blaue Kurve zeigt Messungen mit alleiniger PS-Stimulation (n=57). **(B)** Statistik zu A. **(C)** Mit Forskolin/IBMX: n=56; Ohne Forskolin/IBMX: n=37. **(D)** Statistik zu C.

Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration induzieren. Die möglichen Gründe hierfür werden in der Diskussion erörtert. Eine Erhöhung der cAMP-Konzentration kann auch durch die Aktivierung eines Gα<sub>s</sub>-gekoppelten GPCR herbeigeführt werden [Wallukat 2002]. Bei einer Beteiligung von cAMP an der Inhibition von TRPM3 durch α<sub>2</sub>-Adrenorezeptoren sollte die gleichzeitige Stimulierung von β-Adrenorezeptoren und somit eine Aktivierung der Adenylatcyclase eine Verminderung der TRPM3-Hemmung nach sich ziehen. Aus Abbildung 4-13 ist ersichtlich, dass dies nicht der Fall ist. Die α<sub>2</sub>-Adrenorezeptor-bedingte TRPM3-Inhibition kann durch Applikation von Isoproterenol nicht abgeschwächt werden. Anhand der in Abbildung 4-12 und 4-13 gezeigten Daten scheint eine Beteiligung von cAMP am Inhibitionsmechanismus eher unwahrscheinlich. Dennoch wurde im Folgenden eine Involvierung der PKA, ein Haupteffektor von cAMP, an der α<sub>2</sub>-Adrenorezeptor vermittelten TRPM3-Inhibition, näher untersucht. Es wurden H89 und KT5720, zwei geläufige PKA-Inhibitoren, verwendet. Beide Substanzen hemmen die PKA-Aktivität durch kompetitive Inhibition der ATP-Bindungsstelle an der katalytischen Untereinheit der PKA [Murray 2008]. KT5720 zeigte in Ins1 Zellen eine geringfügige Reduktion der PS induzierten TRPM3-Aktivität und die durch Stimulation von α<sub>2</sub>-Adrenorezeptoren induzierte TRPM3-Hemmung war identisch mit Kontrollmessungen ohne KT5720-Applikation (Abb. 4-14 A). H89 führte jedoch in Ins1 Zellen zu einer drastischen Reduktion der PS-Antwort. Eine Inhibition der verbleibenden TRPM3-Aktivität war allerdings weiterhin zu beobachten (Abb. 4-14 B). Auch in HEK-M3-EYFP Zellen führte H89 zu einer Verminderung der TRPM3-Aktivität,

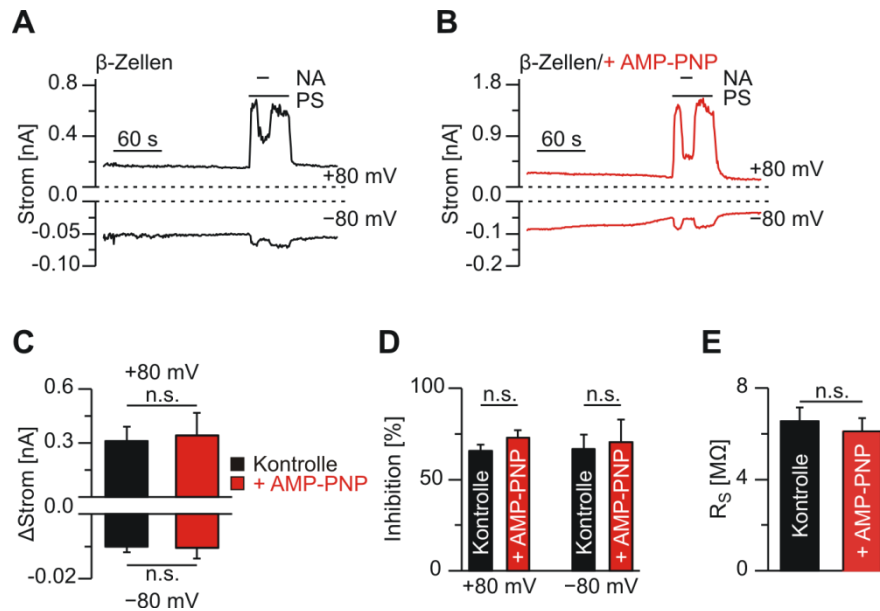


**Abbildung 4-13: Eine Stimulation der Adenylatcyclase durch Aktivierung eines  $G_{\alpha_s}$ -gekoppelten Signalwegs kann die  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor bedingte Hemmung der TRPM3-Aktivität weder aufheben, noch abschwächen.**  $Ca^{2+}$ -Imaging Experimente wurden mit Ins1 Zellen durchgeführt. In allen Messungen wurde dreimal 50  $\mu M$  PS appliziert. (A) Kontrollmessungen, bei denen neben PS nur Clonidin (Clo; 1  $\mu M$ ) appliziert wurde, sind in schwarz dargestellt (n=75). Die rote Kurve zeigt Messungen, bei denen zusätzlich Isoproterenol (Iso; 10  $\mu M$ ) appliziert wurde (n=57). (B) Statistische Auswertung der in A gezeigten Experimente. Die  $\Delta$ ratio (340/380) wurde aus dem Wert bei der zweiten PS-Applikation abzüglich des basalen Wertes vor dieser Applikation errechnet. Die für jede Zelle einzeln berechneten Werte wurden anschließend gemittelt.

wenn auch nicht in gleicher Stärke wie in Ins1 Zellen (Abb. 4-14 C). Falls der Noradrenalin-Effekt durch eine verminderte Aktivität der PKA, bedingt durch eine Erniedrigung des cAMP-Spiegels, vermittelt würde, sollte eine Inaktivierung der PKA eine Reduktion der TRPM3-Aktivität nach sich ziehen. Kinasen brauchen ATP, um ihre Zielproteine phosphorylieren zu können. Tauscht man nun in Whole-Cell Patch-Clamp Experimenten intrazelluläres ATP durch das unhydrolysierbare ATP-Analogon AMP-PNP aus, fehlt der PKA das für die Phosphorylierung notwendige Substrat und die TRPM3-Aktivität sollte vermindert werden. Abbildung 4-15 zeigt jedoch, dass in



**Abbildung 4-14: Pharmakologische Hemmung der PKA führt zu einer Verminderung der TRPM3-Aktivität. Die  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor-bedingte Hemmung der TRPM3-Aktivität wird jedoch nicht aufgehoben.**  $Ca^{2+}$ -Imaging Experimente wurden mit Ins1 Zellen und HEK-M3-EYFP Zellen durchgeführt. Die PS-Konzentration betrug 50  $\mu M$ , die Noradrenalin Konzentration 100 nM. Die roten Kurven zeigen Messungen, die mit den jeweiligen PKA-Inhibitoren behandelt wurden. Die PKA-Inhibitoren KT5720 (1  $\mu M$ ) und H89 (20  $\mu M$ ) wurden entsprechend zwei Stunden vor den eigentlichen Messungen dem Kulturmedium zugegeben und waren auch während der jeweiligen Messungen der Badlösung zugegeben. Schwarze Kurven repräsentieren Kontrollmessungen ohne PKA-Inhibitoren. (A) Mit KT5720: n=57; ohne KT5720: n=38. (B) Mit H89: n=38; ohne H89: n=38. (C) Mit H89: n=38; ohne H89: n=19.



**Abbildung 4-15: Die Aktivität von TRPM3 und die Noradrenalin-bedingte Inhibition der TRPM3-Aktivität sind unabhängig von ATP abhängigen Prozessen.** Whole-Cell Patch-Clamp Experimente wurden mit primären  $\beta$ -Zellen durchgeführt (50  $\mu$ M PS; 1  $\mu$ M NA). (A) Beispielmessung mit ATP in der Pipettenlösung. (B) Beispielmessung mit AMP-PNP statt ATP in der Pipettenlösung. (C, D, E) Statistische Auswertung von Messungen, die wie in A und B durchgeführt wurden (Kontrolle mit ATP: n=9; Mit AMP-PNP: n=10). In C wird der gemittelte Strom während PS-Applikation dargestellt, abzüglich des basalen Stroms kurz vor Applikationsbeginn. D zeigt die gemittelte, durch Noradrenalin induzierte Inhibition der PS-Antwort. In E sind die gemittelten Serienwiderstände dargestellt.

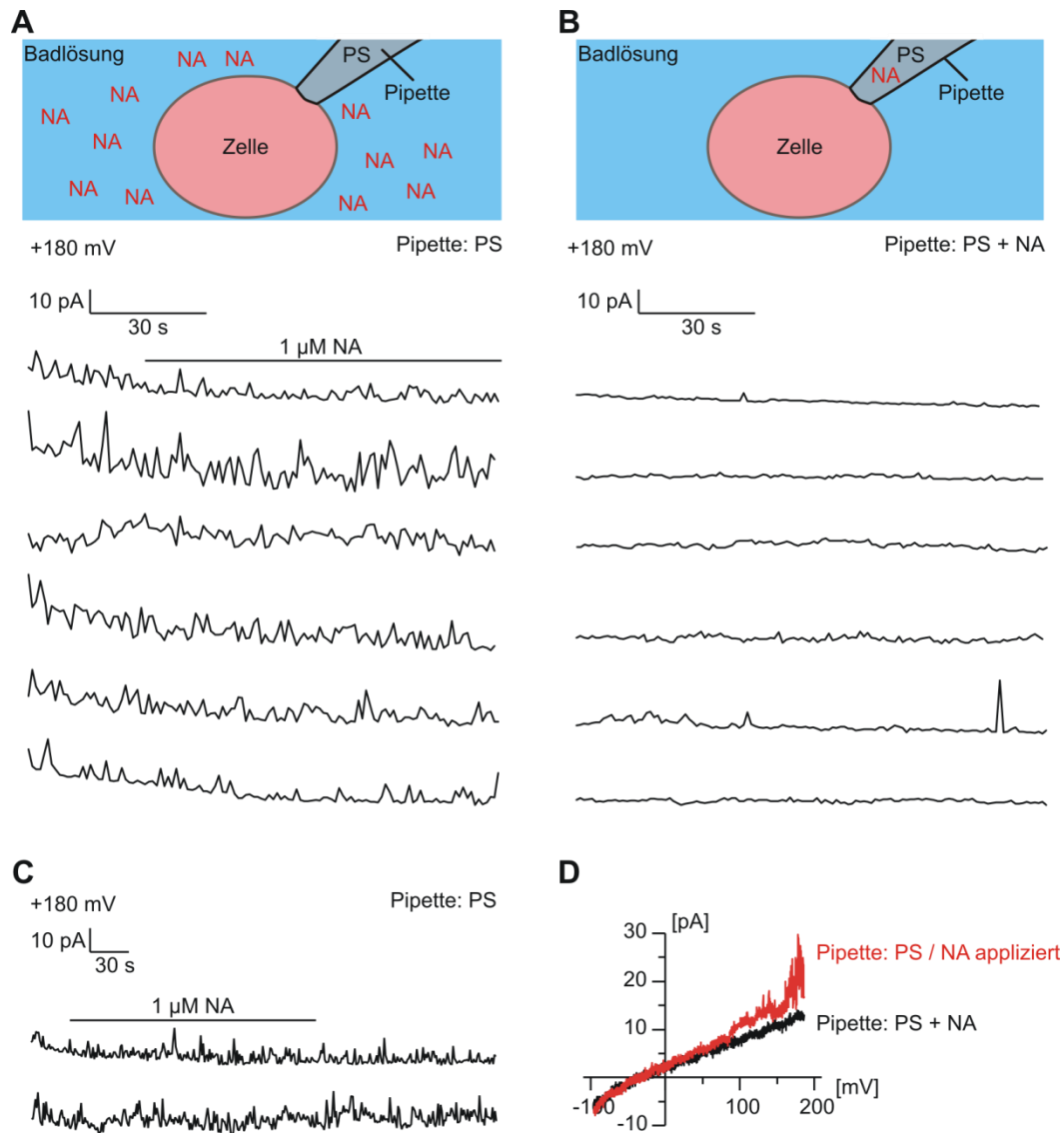
primären  $\beta$ -Zellen die TRPM3-Aktivität in Anwesenheit des unhydrolisierbaren ATP-Analogons (Abb. 4-15 B und C) in gleicher Stärke vorzufinden ist wie in Kontrollmessungen mit ATP (Abb. 4-15 A und C). Auch die durch Noradrenalin induzierte Inhibition zeigte keine signifikante Änderung, wenn ATP durch AMP-PNP ersetzt wurde (Abb. 4-15 D). Bei den Messungen wurde erst nach mehreren Minuten (4-4,5 min nach Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration) PS und Noradrenalin appliziert, um einen vollständigen Austausch des Cytosols mit der Pipettenlösung zu gewährleisten. Der Serienwiderstand betrug bei den Messungen mit AMP-PNP  $6,09 \pm 0,58$  M $\Omega$  und bei den Kontrollmessungen  $6,54 \pm 0,6$  M $\Omega$  (Abb. 4-15 E). Eine Beteiligung der PKA und auch anderer ATP-verbrauchender Vorgänge an der Inhibition von TRPM3 via  $\alpha_2$ -Adrenorezeptoren kann folglich ausgeschlossen werden. Die Reduktion der TRPM3-Aktivität durch H89 muss als unabhängig von der PKA-Inhibition angesehen werden und ist möglicherweise ein direkter Effekt auf TRPM3. Zusammenfassend kann gefolgert werden, dass die  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor-vermittelte Inhibition von TRPM3

unabhängig von der intrazellulären cAMP-Konzentration ist und nicht dem „klassischen“  $G\alpha_i$ - bzw.  $G\alpha_o$ -Signalweg folgt.

#### **4.7 Die TRPM3 Inhibition ist „Membran delimitiert“ und somit unabhängig von löslichen „second messengern“**

Um auszuschließen, dass weitere lösliche „second messenger“ an der TRPM3-Hemmung via  $\alpha_2$ -Adrenorezeptoren beteiligt sind, wurden im Folgenden Patch-Clamp Experimente mit HEK-M3 Zellen, transfiziert mit  $\alpha_{2A}$ -Adrenorezeptoren, in der Cell-Attached-Konfiguration durchgeführt. Dabei wurde nur die Aktivität der Kanäle gemessen, die sich innerhalb des Membranpatches befanden. In der Patchpipette befand sich in allen Messungen 50  $\mu$ M PS, gelöst in Badlösung. Noradrenalin wurde entweder außerhalb des Membranpatches auf die Zellen appliziert oder befand sich ebenfalls in der Pipettenlösung. Im ersten Fall gelangt das applizierte Noradrenalin nicht in den Bereich des Patches (da dieser durch die Pipette dicht umschlossen ist) und kann somit nur  $\alpha_{2A}$ -Adrenorezeptoren, die sich außerhalb des Membranpatches befinden, aktivieren (Abb. 4-16 A und C). Wenn sich Noradrenalin nur in der Pipettenlösung befindet, werden entsprechend nur  $\alpha_{2A}$ -Adrenorezeptoren, die sich innerhalb des Membranpatches befinden, aktiviert (Abb. 4-16 B).

Abbildung 4-16 zeigt, dass die TRPM3-Aktivität nur dann gehemmt wurde, wenn sich Noradrenalin in der Pipettenlösung befand (Abb. 4-16 B). Eine Applikation außerhalb des Membranpatches führte zu keiner Reduktion der Kanalaktivität (Abb. 4-16 A und C). Eine Beteiligung von stark diffusiblen „second messengern“ am Signalweg kann somit ausgeschlossen werden. Diese könnten, wenn sie außerhalb des Membranpatches gebildet würden, über das Cytosol in den Bereich des Patches diffundieren und dort ihre Wirkung entfalten. Der Signalweg ist folglich „Membran delimitiert“ (engl.: membrane delimited) und kann nur Komponenten beinhalten, die mit der Plasmamembran assoziiert sind.



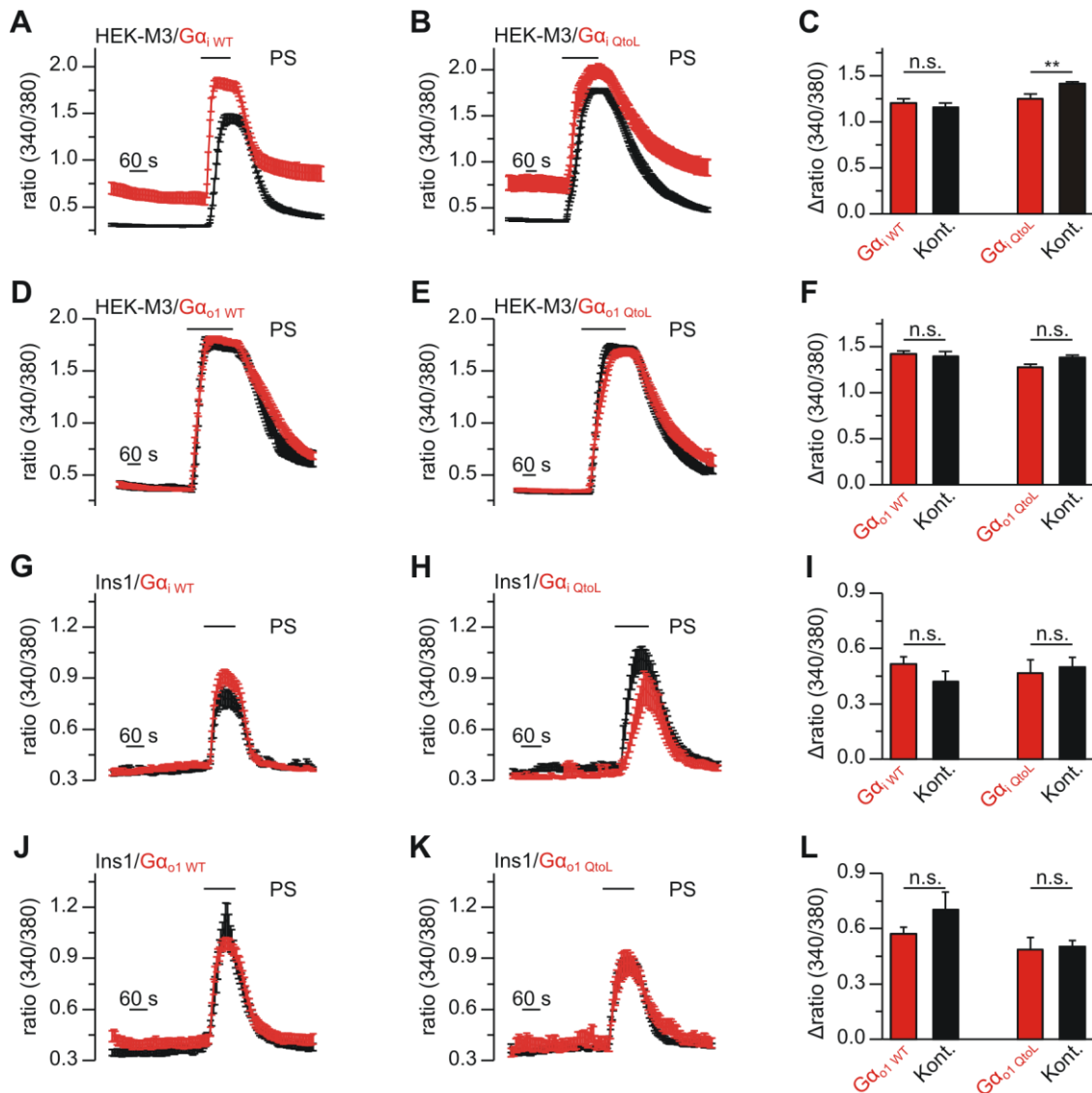
**Abbildung 4-16: Die TRPM3-Inhibition ist unabhängig von löslichen „second messengern“ und somit Membran delimitiert.** Cell-Attached Messungen wurden mit HEK-M3 Zellen, transient transfiziert mit  $\alpha_{2A}$ -Adrenorezeptoren, durchgeführt. Die gemessenen Ströme werden bei nominal +180 mV dargestellt. Jede Stromlinie entspricht einer Messung bzw. Zelle. **(A)** Die Pipettenlösung beinhaltet nur PS (50  $\mu$ M) gelöst in Badlösung. Noradrenalin (1  $\mu$ M) wurde außerhalb des Membranpatches auf die Zellen appliziert. **(B)** Die Pipettenlösung enthielt PS und Noradrenalin (1  $\mu$ M) gelöst in Badlösung. **(C)** Messungen wurden unter denselben Bedingungen wie in A durchgeführt. Noradrenalin wurde jedoch zum Schluss noch ausgewaschen. **(D)** Strom-/Spannungskurve von einer Messung mit PS und Noradrenalin in der Pipettenlösung (schwarze Kurve) bzw. einer Messung mit ausschließlich PS in der Pipettenlösung, während Noradrenalin außerhalb des Membranpatches appliziert wurde (rote Kurve).



#### 4.8 Aktive $G\alpha_i$ - oder $G\alpha_o$ -Untereinheiten sind für die TRPM3-Hemmung nicht ausreichend

Nach Aktivierung des GPCR kommt es zu einer Dissoziation des heterotrimeren G-Proteins in die  $G\alpha$ -Untereinheit und die  $\beta\gamma$ -Untereinheit. Beide sind daraufhin in der Lage, mit Effektoren zu interagieren. Im Folgenden stellte sich die Frage, durch welche der Untereinheiten die  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor-bedingte Inhibition von TRPM3 vermittelt wird oder ob beide Untereinheiten gemeinsam den Effekt induzieren. Die Hemmung könnte beispielsweise direkt durch  $G\alpha$ -Untereinheiten vermittelt werden. Eine direkte Signalübertragung durch  $G\alpha$ -Untereinheiten konnte bereits für mehrere TRP-Kanäle gezeigt werden. TRPC4- und TRPC5-Kanäle werden zum Beispiel direkt durch  $G\alpha_i$ - und  $G\alpha_o$ -Untereinheiten aktiviert [Jeon et al. 2012], wohingegen eine direkte Inhibierung von TRPM8 durch  $G\alpha_q$ -Untereinheiten beschrieben wurde [Zhang et al. 2012]. Um eine direkte oder indirekte Involvierung der  $G\alpha$ -Untereinheiten zu überprüfen, wurden  $Ca^{2+}$ -Imaging Experimente in Ins1 und HEK-M3 Zellen durchgeführt.

Beide Zelltypen wurden jeweils transient mit entweder  $G\alpha_{iWT}$ ,  $G\alpha_{oWT}$ ,  $G\alpha_{iQtoL}$  oder  $G\alpha_{oQtoL}$  transfiziert. Bei  $G\alpha_{iQtoL}$  und  $G\alpha_{oQtoL}$  handelt es sich, bedingt durch eine Punktmutation und einer daraus resultierenden verminderten GTPase Aktivität, um konstitutiv aktive Formen der  $G\alpha_i$ - und  $G\alpha_o$ -Untereinheiten. Sollte die TRPM3-Inhibition primär durch eine Aktivität von  $G\alpha$ -Untereinheiten vermittelt werden, so sollte eine Überexpression der konstitutiv aktiven Varianten zumindest eine Reduktion des TRPM3-Signals bewirken. Abbildung 4-17 zeigt jedoch, dass eine Überexpression von Wildtyp  $G\alpha_i$ - oder  $G\alpha_o$ -Untereinheiten bzw. der konstitutiv aktiven Varianten der  $G\alpha_i$ - oder  $G\alpha_o$ -Untereinheiten in HEK-M3 Zellen und Ins1 Zellen keinen oder nur einen geringen Einfluss auf das durch PS-induzierte Fura-2-Signal haben. Die Überexpression von  $G\alpha_{iWT}$  und  $G\alpha_{iQtoL}$  in HEK-M3 Zellen führte in beiden Fällen zu einer erheblichen Steigerung des basalen  $Ca^{2+}$ -Signals (Abb. 4-17 A und B). Vergleicht man die  $\Delta$ ratio-Werte (PS-Signal abzüglich des basalen  $Ca^{2+}$ -Signals vor PS-Applikation) von Kontrollmessungen und Messungen mit  $G\alpha_{iWT}$ - bzw.  $G\alpha_{iQtoL}$ -Überexpression, zeigt sich nur bei der Überexpression von  $G\alpha_{iQtoL}$  eine geringfügige Reduktion der PS-Antwort (Abb. 4-17 C). Da jedoch die basale  $Ca^{2+}$ -Konzentration so unterschiedlich war, ist ein direkter Vergleich der PS-Signale äußerst schwierig und der geringfügige Unterschied ist vernachlässigbar. Würde TRPM3 durch  $G\alpha_{iQtoL}$  inhibiert werden, würde man eine



**Abbildung 4-17: Überexpression von Wildtyp bzw. konstitutiv aktiven  $G\alpha_i$ - oder  $G\alpha_o$ -Untereinheiten führt zu keiner Verminderung der PS-Antwort.**  $Ca^{2+}$ -Imaging Experimente mit HEK-M3 und Ins1 Zellen, die mit  $G\alpha_{iWT}$ ,  $G\alpha_{oWT}$ ,  $G\alpha_{iQtoL}$  oder  $G\alpha_{oQtoL}$  transient transfiziert wurden (rote Kurven bzw. Balken). Kontrollzellen wurden mit den entsprechenden Kontrollvektoren transient transfiziert (Kont.; schwarze Kurven bzw. Balken). Die statistischen Auswertungen zeigen die gemittelten Werte bei PS (50  $\mu$ M) Applikation abzüglich des basalen Wertes vor PS-Applikation (**A**) HEK-M3 Zellen mit  $G\alpha_{iWT}$ : n=31; Kontrolle: n=37. (**B**) HEK-M3 Zellen mit  $G\alpha_{iQtoL}$ : n=35; Kontrolle: n=55. (**C**) Statistische Auswertung zu A und B. (**D**) HEK-M3 Zellen mit  $G\alpha_{oWT}$ : n=56; Kontrolle: n=19. (**E**) HEK-M3 Zellen mit  $G\alpha_{oQtoL}$ : n=56; Kontrolle: n=37. (**F**) Statistische Auswertung zu D und E. (**G**) Ins1 Zellen mit  $G\alpha_{iWT}$ : n=43; Kontrolle: n=29. (**H**) Ins1 Zellen mit  $G\alpha_{iQtoL}$ : n=13; Kontrolle: n=19. (**I**) Statistische Auswertung zu G und H. (**J**) Ins1 mit  $G\alpha_{oWT}$ : n=32; Kontrolle: n=16. (**K**) Ins1 Zellen mit  $G\alpha_{oQtoL}$ : n=14; Kontrolle: n=22. (**L**) Statistische Auswertung zu J und K.

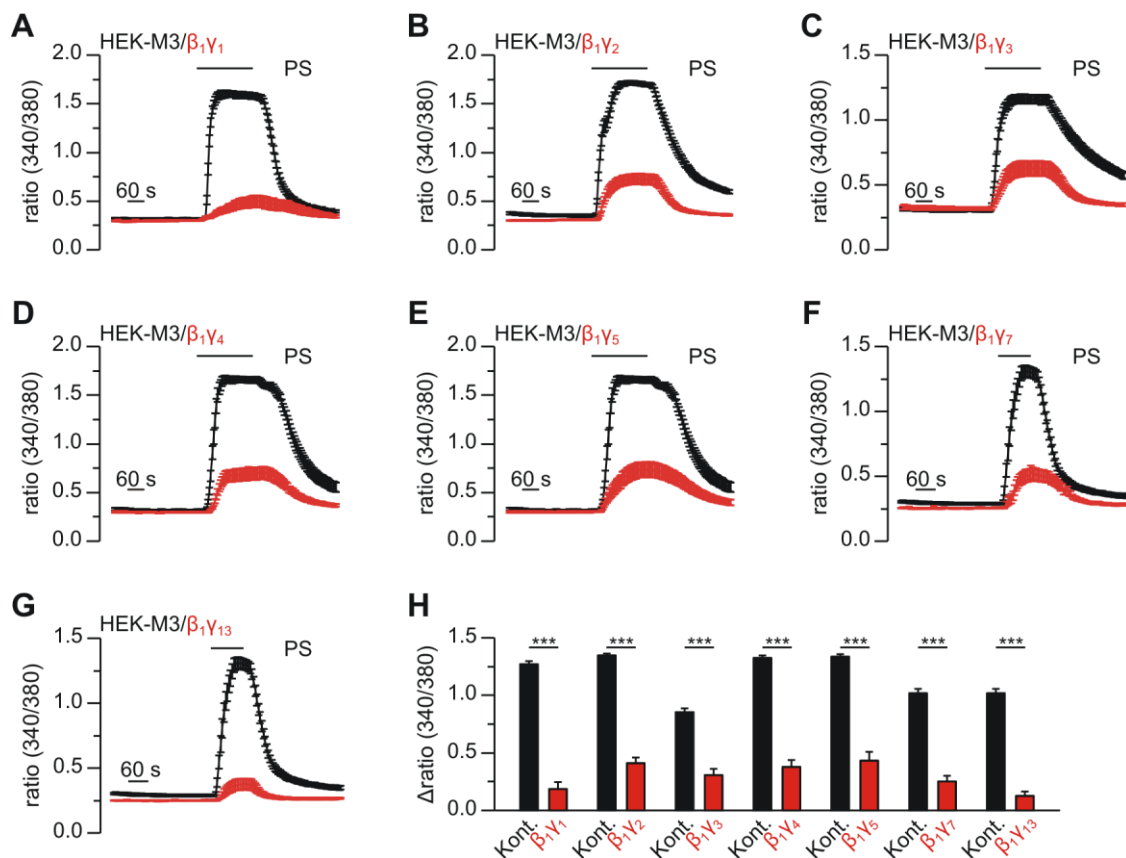
viel stärkere Hemmung erwarten. Bei der Überexpression von  $G\alpha_{oWT}$  und  $G\alpha_{oQtoL}$  in HEK-M3 Zellen war kein Anstieg des basalen  $Ca^{2+}$  zu beobachten und eine Verminderung der TRPM3-Aktivität lag ebenfalls nicht vor (Abb. 4-17 D, E und F). Die

Experimente mit Ins1 Zellen zeigten ein ähnliches Bild (Abb. 4-17 G-L). Keine der getesteten  $G\alpha$ -Untereinheiten induzierte eine Verminderung des PS-Signals. In Ins1 Zellen jedoch führte die Überexpression von  $G\alpha_{iWT}$  und  $G\alpha_{iQtoL}$ , im Gegensatz zu den Messungen in HEK-M3 Zellen, zu keiner Steigerung des basalen  $Ca^{2+}$ -Signals.

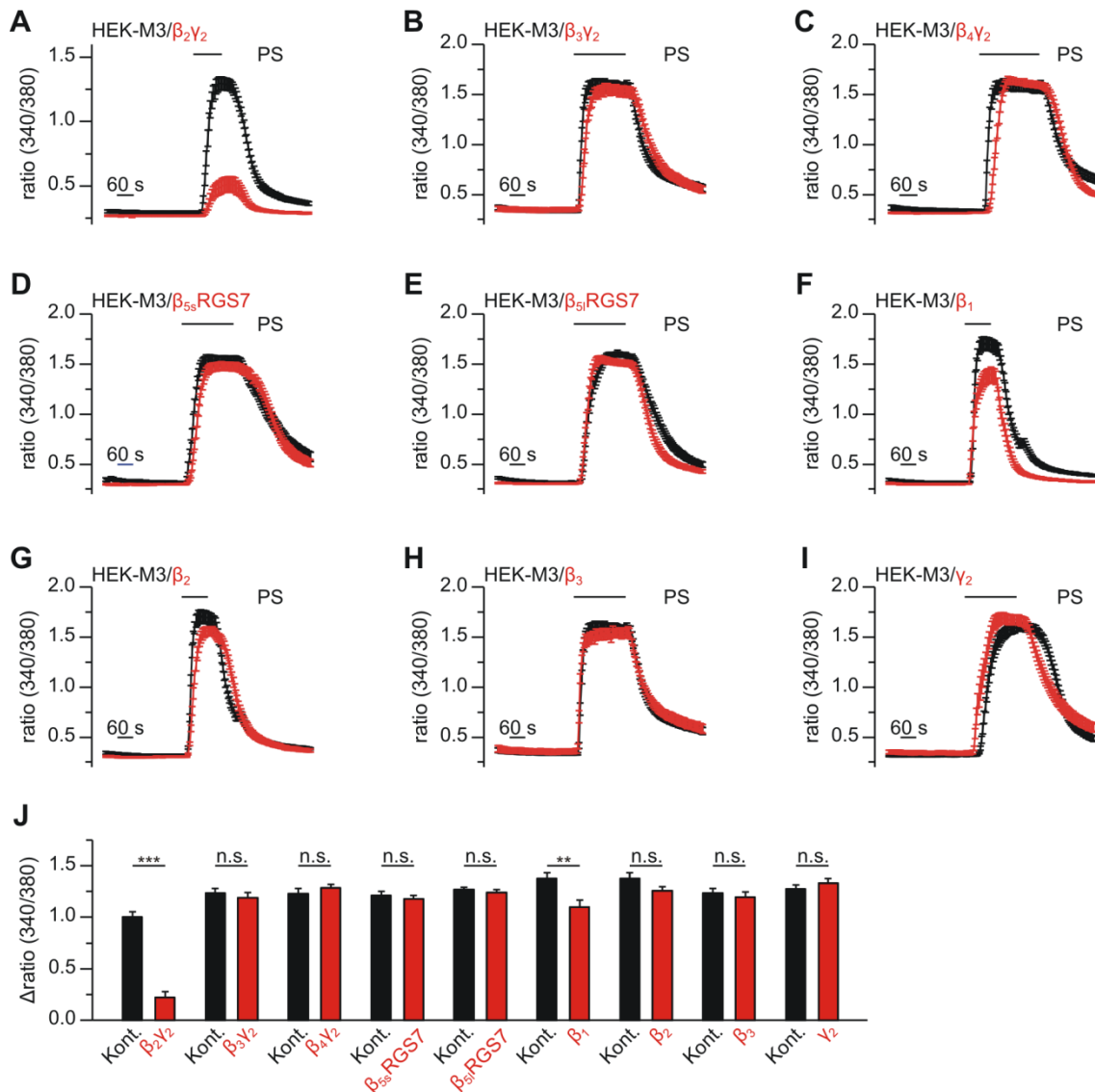
Eine direkte oder indirekte Beteiligung der  $G\alpha$ -Untereinheiten an der  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor vermittelten TRPM3-Inhibition kann somit als unwahrscheinlich angesehen werden.

## 4.9 Überexpression von $\beta\gamma$ -Untereinheiten führt zu einer verminderten PS-Antwort

Als nächstes wurde die Rolle der  $\beta\gamma$ -Untereinheiten in Bezug auf die TRPM3-Inhibition untersucht. Hierfür wurden verschiedene  $\beta$ -Untereinheiten zusammen mit verschiedenen  $\gamma$ -Untereinheiten in HEK-M3 Zellen überexprimiert. In  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging Experimenten wurde daraufhin die durch PS stimulierte TRPM3-Aktivität

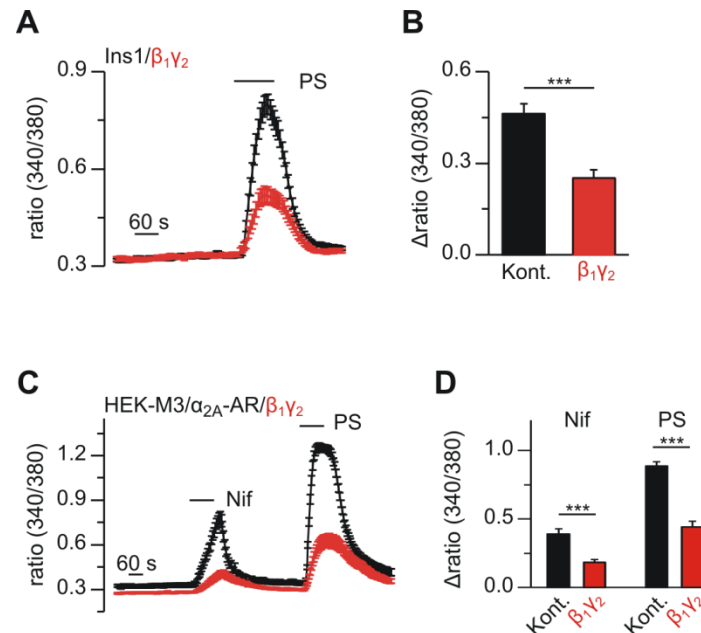


**Abbildung 4-18: Überexpression von  $\beta_1$ -Untereinheiten zusammen mit  $\gamma$ -Untereinheiten führt zu einer starken Verminderung der PS-Antwort.** HEK-M3 Zellen wurden transient mit  $\beta_1$  und einer  $\gamma$ -Untereinheiten transfiziert ( $\beta_1\gamma_1$ ,  $\beta_1\gamma_2$ ,  $\beta_1\gamma_3$ ,  $\beta_1\gamma_4$ ,  $\beta_1\gamma_5$ ,  $\beta_1\gamma_7$  oder  $\beta_1\gamma_{13}$ ) und in  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging Experimenten bezüglich ihrer PS-Antwort (50  $\mu\text{M}$ ) untersucht (rote Kurven). Kontrollzellen wurden mit den entsprechenden Kontrollvektoren transient transfiziert (schwarze Kurven). (A) Mit  $\beta_1\gamma_1$ : n=31; Kontrolle: n=19. (B) Mit  $\beta_1\gamma_2$ : n=98; Kontrolle: n=119. (C) Mit  $\beta_1\gamma_3$ : n=56; Kontrolle: n=56. (D) Mit  $\beta_1\gamma_4$ : n=37; Kontrolle: n=37. (E) Mit  $\beta_1\gamma_5$ : n=33; Kontrolle: n=37. (F) Mit  $\beta_1\gamma_7$ : n=37; Kontrolle: n=46. (G) Mit  $\beta_1\gamma_{13}$ : n=49; Kontrolle: n=46. (H) Statistische Auswertung der in A-G gezeigten Experimente. Dargestellt ist das jeweilige gemittelte Fura-2-Signal während PS-Applikation abzüglich des basalen Signals vor Applikation ( $\Delta\text{ratio (340/380)}$ ). Die schwarzen Balken repräsentieren die jeweiligen gemittelten Werte der Kontrollmessungen. Zur Signifikanzüberprüfung wurden die jeweiligen Messungen mit den Kontrollmessungen vom selben Messtag verglichen. Teilweise sind die Kontrollmessungen identisch, da die jeweiligen Experimente am selben Tag durchgeführt wurden.



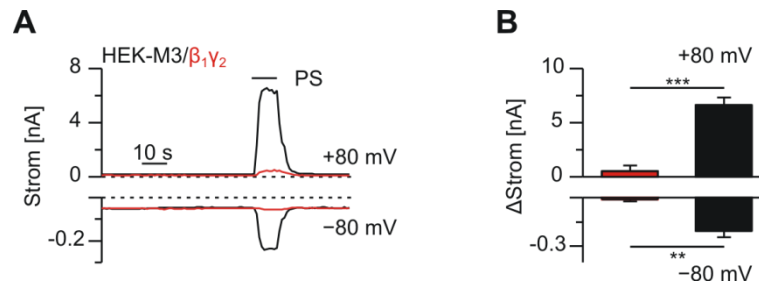
**Abbildung 4-19: Überexpression von  $\beta_2$  zusammen mit  $\gamma_2$  führt ebenfalls zur Reduktion der PS-Antwort. Überexpression von  $\beta_3$  oder  $\beta_4$  zusammen mit  $\gamma_2$  und  $\beta_5$  zusammen mit RGS7 vermindert das PS-Signal hingegen nicht.** HEK-M3 Zellen wurden transient mit verschiedenen  $\beta\gamma$ -Untereinheiten bzw. RGS7 transfiziert und in  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging Experimenten bezüglich ihrer PS-Antwort (50  $\mu\text{M}$ ) untersucht (rote Kurven). Kontrollzellen wurden mit den entsprechenden Kontrollvektoren transient transfiziert (schwarze Kurven). (A) Mit  $\beta_2\gamma_2$ : n=35; Kontrolle: n=53. (B) Mit  $\beta_3\gamma_2$ : n=42; Kontrolle: n=32. (C) Mit  $\beta_4\gamma_2$ : n=31; Kontrolle: n=32. (D) Mit  $\beta_{5S}RGS7$ : n=38; Kontrolle: n=38. (E) Mit  $\beta_{5L}RGS7$ : n=52; Kontrolle: n=52. (F) Mit  $\beta_1$ : n=38; Kontrolle: n=34. (G) Mit  $\beta_2$ : n=38; Kontrolle: n=34. (H) Mit  $\beta_3$ : n=18; Kontrolle: n=32. (I)  $\gamma_2$ : n=36; Kontrolle: n=38. (J) Statistische Auswertung der in A-G gezeigten Experimente. Dargestellt ist das jeweilige gemittelte Fura-2-Signal während PS-Applikation abzüglich des basalen Signals vor Applikation ( $\Delta$ ratio (340/380)). Die schwarzen Balken repräsentieren die jeweiligen gemittelten Werte der Kontrollmessungen. Zur Signifikanzüberprüfung wurden die jeweiligen Messungen mit den Kontrollmessungen vom selben Messtag verglichen. Teilweise sind die Kontrollmessungen identisch, da die jeweiligen Experimente am selben Tag durchgeführt wurden.

der  $\beta\gamma$ -exprimierenden Zellen (rote Kurven) mit Zellen verglichen, die lediglich mit den



**Abbildung 4-20: Auch in Ins1 Zellen führt die Überexpression von  $\beta_1\gamma_2$  zu einer starken Verminderung der PS-Antwort. Die durch Nifedipin induzierte PS-Aktivität wird auch durch Überexpression von  $\beta_1\gamma_2$  reduziert.** Ins1 Zellen wurden entweder mit  $\beta_1\gamma_2$  (rote Kurve) oder den entsprechenden Kontrollvektoren (Kont., schwarze Kurve) transient transfiziert und in  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging Experimenten auf ihre PS-Antwort hin untersucht. (A) Mit  $\beta_1\gamma_2$ : n=63. Kontrolle: n=84. (B) Statistik zu den in A gezeigten Messungen. Dargestellt ist das jeweilige gemittelte Fura-2-Signal während PS-Applikation abzüglich des basalen Signals vor Applikation ( $\Delta$ ratio (340/380)). (C) HEK-M3 Zellen wurden mit  $\beta_1\gamma_2$  (rote Kurve, n=28) oder den entsprechenden Kontrollvektoren (schwarze Kurve, n=37) transient transfiziert und in  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging Experimenten auf ihre Antwort auf PS (50  $\mu\text{M}$ ) und Nifedipin (Nif, 50  $\mu\text{M}$ ) hin untersucht. (D) Statistische Auswertung der in C gezeigten Experimente. Dargestellt sind die gemittelten Fura-2-Signale während PS- bzw. Nifedipin-Applikation, abzüglich der basalen Signale vor der jeweiligen Applikation.

Kontrollvektoren (pcDNA3 (als Ersatz für die jeweiligen  $\beta\gamma$ -Untereinheiten) und pCAGGSL1 bzw. pcDNA3-IRESGFP) transfiziert wurden (schwarze Kurven). Abbildung 4-18 zeigt, dass die Expression der  $\beta_1$  zusammen mit verschiedenen  $\gamma$ -Untereinheiten in allen Fällen zu einer starken Verminderung des PS-Signals führte. Die Überexpression von  $\beta_2$  zusammen mit  $\gamma_2$  zeigte eine vergleichbare Reduktion der Kanalaktivität (Abb. 4-19 A). Die Überexpression aller weiteren getesteten  $\beta\gamma$ -Kombinationen ( $\beta_3\gamma_2$  und  $\beta_4\gamma_2$ ), sowie die Überexpression von  $\beta_{5S}$  und  $\beta_{5L}$  zusammen mit RGS7 führten hingegen zu keiner Verminderung der PS-Antwort (Abb. 4-19 B-E). Die alleinige Überexpression von  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  oder  $\gamma_2$  (Abb. G-I) zog ebenfalls keine Hemmung der Kanalaktivität nach sich. In Zellen, die nur  $\beta_1$  überexprimierten, konnte eine kleine aber signifikante Reduktion des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals beobachtet werden (Abb. 4-19 F). Die Kontrollmessungen wurden



**Abbildung 4-21: Überexpression von  $\beta_1\gamma_2$  führt zu einer starken Reduktion der PS induzierten TRPM3-Ströme.** Whole-Cell Patch-Clamp Experimente wurden mit HEK-M3 Zellen durchgeführt, die transient mit  $\beta_1\gamma_2$  (rote Kurve bzw. Balken) oder den entsprechenden Kontrollvektoren (schwarze Kurve bzw. Balken) transfiziert wurden. In allen Messungen wurde 50  $\mu$ M PS appliziert. (A) Beispielmessungen. (B) Statistische Auswertung von Messungen, die wie in A (Mit  $\beta_1\gamma_2$ : n=10; Kontrolle: n=7) durchgeführt wurden. Gezeigt wird der gemittelte Strom während PS-Applikation, abzüglich des basalen Stroms kurz vor Applikationsbeginn.

jeweils am gleichen Tag gemessen, immer abwechselnd mit den  $\beta\gamma$ -Experimenten. In Ins1 Zellen ist ein vergleichbarer Effekt zu beobachten. Zellen, die mit  $\beta_1$  und  $\gamma_2$  (und pCAGGSL1) transfiziert wurden (Abb. 4-20 A und B, rote Kurve bzw. roter Balken), zeigten eine starke und signifikante Reduzierung der TRPM3-Aktivität, induziert durch PS, im Vergleich zu Zellen, die nur mit den entsprechenden Kontrollvektoren (pcDNA3 (als Ersatz für die  $\beta\gamma$ -Untereinheiten) und pCAGGSL1) transfiziert wurden (schwarze Kurve bzw. schwarzer Balken). Aus Abbildung 4-20 C und D ist ersichtlich, dass die  $\beta_1$  und  $\gamma_2$  Überexpression auch zu einer Verminderung der durch Nifedipin induzierten TRPM3-Aktivität führte.

Um die Daten aus den  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging Experimenten zu verifizieren, wurden anschließend Patch-Clamp Experimente mit HEK-M3 Zellen durchgeführt. Eine Überexpression von  $\beta_1$  und  $\gamma_2$  (Zellen wurden mit  $\beta_1$ ,  $\gamma_2$  und pCAGGSL1 transfiziert) führte zu einer deutlichen Reduzierung der PS induzierten Einwärts- und Auswärtsströme (Abb. 4-21, rote Kurve). Der Vergleich zu den gemessenen Stromgrößen in Kontrollzellen (schwarze Kurve; transfiziert mit pcDNA3 (als Ersatz für die  $\beta\gamma$ -Untereinheiten) und pCAGGSL1) zeigt, dass es sich um einen starken und signifikanten Effekt handelt (Abb. 4-21 B).

Es lässt sich zusammenfassen, dass eine Überexpression von  $\beta\gamma$ -Untereinheiten zu einer Verminderung der TRPM3-Aktivität führt und eine Selektivität bezüglich der  $\beta$ -Untereinheiten vorliegt, da nur  $\beta_1$  und  $\beta_2$  (in Kombination mit einer  $\gamma$ -Untereinheit) eine starke Verminderung der PS-Antwort hervorriefen. Eine Selektivität bezüglich der  $\gamma$ -Untereinheit liegt anscheinend nicht vor, da alle zusammen mit  $\beta_1$  getesteten  $\gamma$ -

Untereinheiten, einen vergleichbaren Effekt hervorriefen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Inhibition von TRPM3 via  $\alpha_2$ -Adrenorezeptoren durch  $\beta\gamma$ -Untereinheiten vermittelt wird.

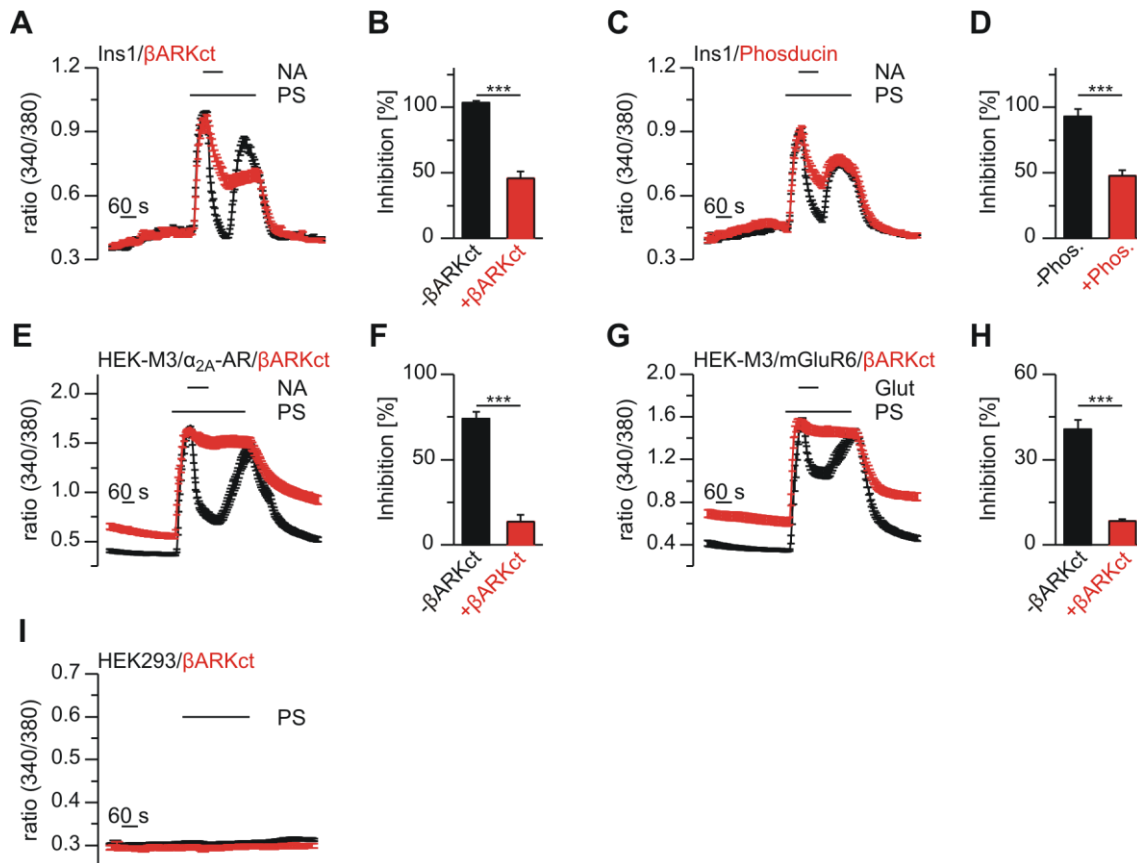
#### **4.10 Expression von $\beta\gamma$ -Scavengern schwächt den Noradrenalin-Effekt ab**

Um die Rolle von  $\beta\gamma$ -Untereinheiten bei der TRPM3-Hemmung weiter zu beleuchten, wurden im folgenden Experimente mit sogenannten  $\beta\gamma$ -Scavengern durchgeführt. Dabei handelt es sich um Proteine, die in der Lage sind,  $\beta\gamma$ -Untereinheiten spezifisch zu binden und somit deren Interaktion mit weiteren Effektoren zu verhindern. In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl Phosducin, als auch  $\beta$ -ARKct verwendet.

Phosducin wird unter anderem in Photorezeptoren exprimiert und moduliert dort die Phototransduktionskaskade bei der Hell-/Dunkel-Adaption, indem es die  $\beta\gamma$ -Untereinheit des Transducin bindet. Durch diese Bindung vermag die  $G\alpha$ -Untereinheit des Transducin länger aktiviert zu bleiben, so dass die Erregung nach einem Signalstimulus verlängert wird. Die Aktivität des Phosducin wird wiederum durch die PKA gesteuert und eine Phosphorylierung führt zu einer Verminderung der  $\beta\gamma$ -Affinität [Lee et al. 1987; Kuo et al. 1989; Schulz 2001].

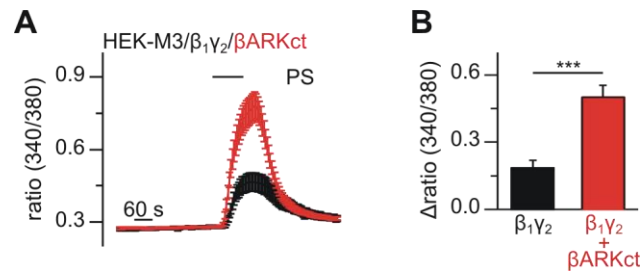
Bei  $\beta$ -ARKct handelt es sich um den C-Terminus der  $\beta$ -Adrenorezeptorkinase, der in der Lage ist,  $\beta\gamma$ -Untereinheiten zu binden. Die  $\beta$ -Adrenorezeptorkinase (auch GRK2) gehört zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen (GRKs) und ist ein ubiquitär vorkommendes Protein. GRKs spielen eine wichtige Rolle bei der Desensibilisierung von GPCR durch Phosphorylierung von aktiven Rezeptoren. Die  $\beta$ -Adrenorezeptorkinase reguliert unter anderem Adrenorezeptoren im Herz und beeinflusst auf diese Weise die Herzrate [Lodowski et al 2003]. Für beide Proteine konnte gezeigt werden, dass sie die  $\beta\gamma$ -vermittelte Signaltransduktion durch Abfangen der  $\beta\gamma$ -Untereinheiten abschwächen können und sind deshalb häufig genutzte molekulare Werkzeuge, um  $\beta\gamma$ -gekoppelte Signalwege zu untersuchen [Koch et al. 1994; Blackmer et al. 2005; Rishal et al. 2005]. In den nachfolgenden Experimenten wurde Phosducin und  $\beta$ -ARKct mit einem angefügten Myristoylierungssignal verwendet (myr-Phosducin und myr- $\beta$ -ARKct), da gezeigt werden konnte, dass eine Myristoylierung den Proteinen hilft, mit der Plasmamembran zu assoziieren und somit eine höhere Konzentration der  $\beta\gamma$ -





**Abbildung 4-22: Expression von  $\beta\gamma$ -Scavengern (myr- $\beta$ -ARKct und myr-Phosducin) schwächt die inhibitorische Wirkung von  $G\alpha_i$ -/ $G\alpha_o$ -gekoppelten GPCR auf die TRPM3-Aktivität ab.**  $Ca^{2+}$ -Imaging Experimente wurden sowohl in Ins1 Zellen als auch im heterologen Überexpressionssystem durchgeführt (HEK-M3 Zellen). Die roten Kurven zeigen Zellen, die mit dem entsprechenden  $\beta\gamma$ -Scavengern transient transfiziert wurden. Die schwarzen Kurven repräsentieren Kontrollmessungen ohne  $\beta\gamma$ -Scavenger. Substanzen wurden in folgenden Konzentrationen appliziert: 50  $\mu$ M PS; 50 nM NA (A-D); 100 nM NA (E, F); 1 mM Glutamat (Glut). (A) Transfiziert mit myr- $\beta$ -ARKct: n=53; Untransfizierte Kontrolle: n=122. (B) Statistik zu A. (C) Transfiziert mit myr-Phosducin: n=90; Untransfizierte Kontrolle: n=187. (D) Statistik zu C. (E) Transfiziert mit  $\alpha_{2A}$ -AR und myr- $\beta$ -ARKct: n=79; Transfiziert nur mit  $\alpha_{2A}$ -AR: n=75. (F) Statistik zu E. (G) Transfiziert mit mGluR6 und myr- $\beta$ -ARKct: n=44; Transfiziert nur mit mGluR6: n=26. (H) Statistik zu G. (I) Messungen mit HEK293 Zellen, die TRPM3 nicht stabil exprimieren. Transfiziert mit myr- $\beta$ -ARKct: n=21; Untransfizierte Kontrolle: n=45.

Scavenger an der Membran erreicht werden konnte [Rishal et al. 2005]. In  $Ca^{2+}$ -Imaging Experimenten mit Ins1 Zellen bewirkt die Überexpression sowohl von myr- $\beta$ -ARKct (Abb. 4-22 A und B), als auch myr-Phosducin (Abb. 4-22 C und D) und damit das Abfangen von  $\beta\gamma$ -Untereinheiten, eine signifikante Reduktion der  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor vermittelten Inhibition der TRPM3-Aktivität (rote Kurven bzw. rote Balken). Die durch Noradrenalin initiierte Hemmung liegt etwa um 50 % niedriger verglichen mit untransfizierten Kontrollmessungen (schwarze Kurven bzw. schwarze Balken).



**Abbildung 4-23: Expression des  $\beta\gamma$ -Scavengers myr- $\beta$ -ARKct schwächt die durch Expression von  $\beta_1\gamma_2$  induzierte Reduktion der TRPM3-Aktivität ab.**  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging Experimente wurden mit HEK-M3 Zellen durchgeführt. Die rote Kurve zeigt Zellen, die transient mit  $\beta_1\gamma_2$  und myr- $\beta$ -ARKct transfiziert wurden. Die schwarze Kurve repräsentiert Zellen, die mit  $\beta_1\gamma_2$  und dem entsprechenden Kontrollvektor transfiziert wurden. **(A)** Mit  $\beta_1\gamma_2$  und myr- $\beta$ -ARKct: n=70; Mit  $\beta_1\gamma_2$  und Kontrollvektor: n=39. **(B)** Statistische Auswertung der in A gezeigten Messungen. Die  $\Delta\text{ratio}$  (340/380) beschreibt das gemittelte Fura-2-Signal während der PS-Applikation abzüglich des basalen Signals vor PS-Applikation.

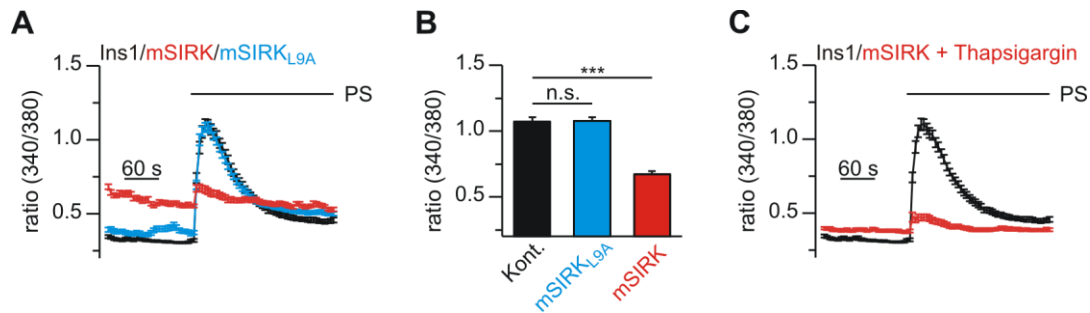
Auch im heterologen Überexpressionssystem kann myr- $\beta$ -ARKct die Hemmung von TRPM3 aufheben. Abbildung 4-22 E zeigt HEK-M3 Zellen, die  $\alpha_{2A}$ -Adrenorezeptoren und myr- $\beta$ -ARKct (rote Kurve) bzw.  $\alpha_{2A}$ -Adrenorezeptoren und den entsprechenden Kontrollvektor (schwarze Kurve) überexprimieren. Hier ist der myr- $\beta$ -ARKct-Effekt sogar noch ausgeprägter als in Ins1 Zellen. In Zellen, die den  $\beta\gamma$ -Scavenger exprimieren, ist die  $\alpha_{2A}$ -Adrenorezeptor-bedingte TRPM3-Inhibition nahezu komplett aufgehoben, wohingegen in Zellen ohne myr- $\beta$ -ARKct eine starke Hemmung von gemittelt etwa 75 % erreicht wird (Abb. 4-22 F). Auch die durch mGluR6 induzierte Reduktion der TRPM3-Aktivität in HEK-M3 Zellen kann durch Expression von myr- $\beta$ -ARKct nahezu vollständig aufgehoben werden (Abb. 4-22 G und H). Auffällig ist weiterhin, dass die Überexpression des  $\beta\gamma$ -Scavengers im heterologen Überexpressionssystem schon zu einer basalen Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führt. Da in HEK293 Zellen (die TRPM3 nicht stabil exprimieren) eine Expression von myr- $\beta$ -ARKct in  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging Experimenten keine Erhöhung der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (Abb. 4-22 I) nach sich zieht, scheint es sich um einen TRPM3 spezifischen Effekt zu handeln. Der  $\beta\gamma$ -Scavenger scheint  $\beta\gamma$ -Untereinheiten zu binden, die ansonsten bereits im unstimulierten Zustand die Aktivität des Kanals inhibieren. Die Folge scheint eine gesteigerte konstitutive Aktivität zu sein. Warum das Abfangen der  $\beta\gamma$ -Untereinheiten nicht auch den basalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel in Ins1 Zellen erhöht, ist jedoch unklar. Ein möglicher Grund könnte die geringere Expression von TRPM3-Kanälen in Ins Zellen

sein, so dass eine Steigerung der konstitutiven Aktivität keinen größeren Einfluss auf den basalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Level hat.

Die Expression von myr- $\beta$ -ARKct bewirkt weiterhin eine Verminderung der durch Überexpression von  $\beta\gamma$ -Untereinheiten induzierten Reduktion des PS-Signals. HEK-M3 Zellen, die neben  $\beta_1$  und  $\gamma_2$  den  $\beta\gamma$ -Scavenger exprimieren, zeigen in  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging Experimenten eine deutlich stärkere PS-Antwort als Zellen, die nur  $\beta\gamma$ -Untereinheiten exprimieren (Abb. 4-23).

#### **4.11 Freisetzung von $\beta\gamma$ -Untereinheiten durch mSIRK hemmt die TRPM3-Aktivität**

Bei mSIRK handelt es sich um ein membranpermeables, myristoyliertes Peptid, das die Fähigkeit besitzt, an  $\beta\gamma$ -Untereinheiten zu binden. Eine Bindung zieht eine Dissoziation der  $\beta\gamma$ -Untereinheit von der  $\alpha$ -Untereinheit nach sich, ohne dass ein Nukleotidaustausch induziert wird. Die  $\alpha$ -Untereinheit sollte somit in einem inaktiven Zustand verbleiben. Trotz der mSIRK-Bindung ist die  $\beta\gamma$ -Untereinheit weiterhin in der Lage, mit Effektoren zu interagieren. Das Peptid mSIRK<sub>L9A</sub> hingegen ist aufgrund einer Punktmutation nicht mehr in der Lage,  $\beta\gamma$ -Untereinheiten zu binden bzw. freizusetzen und dient somit als Kontrollsubstanz zu mSIRK [Goubaeva et al. 2003; Smrcka 2008]. Um zu überprüfen, ob mSIRK durch Freisetzung von  $\beta\gamma$ -Untereinheiten eine Inhibition der TRPM3-Aktivität in  $\beta$ -Zellen induzieren kann, wurden  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging Experimente in Ins1 Zellen durchgeführt. Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit des mSIRK-Peptids wurden alle Messungen mit dem  $\beta\gamma$ -Bindepeptid in einer offenen Kammer ohne Superfusion und nicht wie sonst in einem geschlossenen System mit konstantem Lösungsaustausch durchgeführt. Die applizierten Substanzen wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten in die Messkammer pipettiert. Für die Experimente wurden die Zellen 30 min mit 30  $\mu\text{M}$  mSIRK oder mSIRK<sub>L9A</sub> präinkubiert und auch während der Messungen enthielt die Lösung dieselbe Konzentration des entsprechenden Peptids (mit Ausnahme der Kontrollmessungen). Die Präinkubation mit dem  $\beta\gamma$ -Bindepeptid sollte eine starke Freisetzung von  $\beta\gamma$ -Untereinheiten gewährleisten. Ins1 Zellen, die mit mSIRK behandelt wurden, zeigten ein extrem reduziertes  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal nach PS-Stimulierung (Abb. 4-24 A, rote Kurve). Unbehandelte Zellen hingegen zeigten, wie erwartet, einen starken Anstieg des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals nach



**Abbildung 4-24: Ins1 Zellen, die mit dem  $\beta\gamma$ -Bindepeptid mSIRK behandelt wurden, zeigen eine stark verminderte PS-Antwort. (A)**  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging Experimente wurden mit Ins1 durchgeführt. Zellen wurden 30 min mit 30  $\mu\text{M}$  mSIRK (rote Kurve) oder 30  $\mu\text{M}$  mSIRK<sub>L9A</sub> (blaue Kurve) präinkubiert. Auch während der Messungen war das jeweilige Peptid der Lösung zugegeben. Die schwarze Kurve zeigt unbehandelte Kontrollmessungen. **(B)** Statistische Auswertung der in A gezeigten Experimente. Gezeigt wird das gemittelte Fura-2-Signal bei PS-Applikation. **(C)** Die rote Kurve zeigt Zellen, die für 30 min mit 30  $\mu\text{M}$  mSIRK und 5  $\mu\text{M}$  Thapsigargin präinkubiert wurden. Unbehandelte Kontrollmessungen sind in schwarz dargestellt. In allen Messungen wurde 50  $\mu\text{M}$  PS appliziert.

Applikation von PS (Abb. 4-24 A, schwarze Kurve). Ebenso reagierten Zellen, die mit mSIRK<sub>L9A</sub> behandelt wurden, mit einem starken Anstieg des Fura-2-Signals nach Applikation von PS, vergleichbar zu den Kontrollmessungen (Abb. 4-24 A, blaue Kurve). Auffällig ist, dass die mit mSIRK behandelten Zellen ein deutlich höheres basales  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal aufweisen als die Kontrollzellen bzw. die mit mSIRK<sub>L9A</sub> behandelten Zellen. Goubaeva et al. konnten jedoch zeigen, dass mSIRK eine Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern herbeiführt und so einen Anstieg der basalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration induziert ( $\beta\gamma$ -Untereinheiten aktivieren wahrscheinlich die PLC und das dadurch entstehende  $\text{IP}_3$  induziert die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem endoplasmatischen Reticulum). Der Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration konnte durch Entleerung der intrazellulären Speicher mittels Thapsigargin reduziert werden [Goubaeva et al. 2003]. Thapsigargin hemmt SERCA- (sarkoplasmatisches, endoplasmatisches Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) Proteine, die unter ATP-Verbrauch  $\text{Ca}^{2+}$  in das endoplasmatische Reticulum transportieren. Abbildung 4-24 C zeigt, dass mSIRK behandelte Zellen, die zusätzlich für 30 min mit 5  $\mu\text{M}$  Thapsigargin inkubiert wurden, ein deutlich niedrigeres basales  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal aufweisen. Die PS-Antwort ist aber weiterhin stark reduziert.

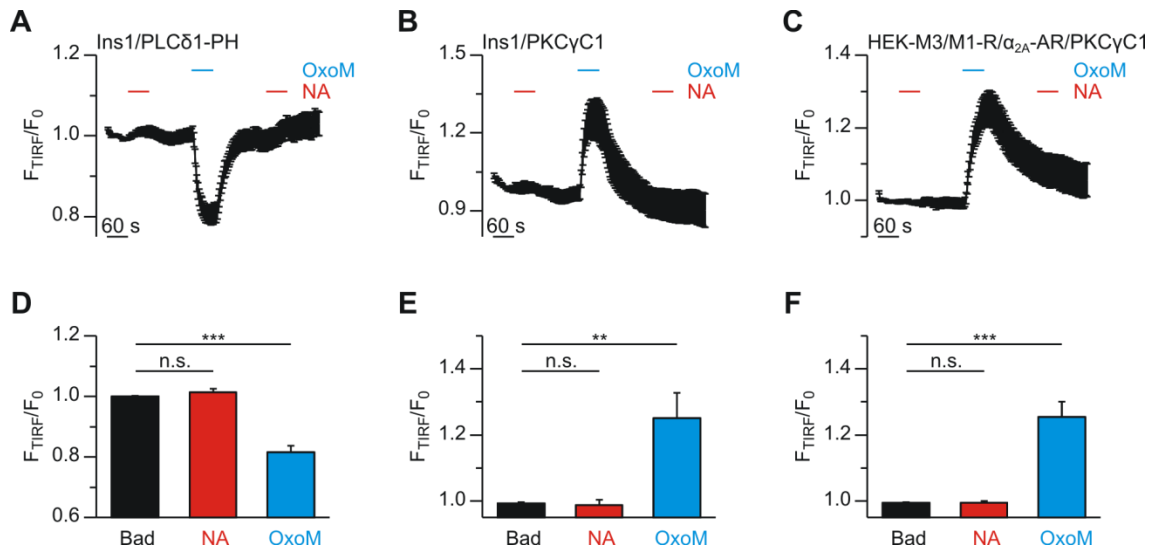
Die  $\beta\gamma$ -Überexpressionsexperimente, die Experimente mit den  $\beta\gamma$ -Scavengern als auch die Messungen mit dem  $\beta\gamma$ -Aktivator mSIRK geben eindeutige Hinweise auf eine

Beteiligung von  $\beta\gamma$ -Untereinheiten an der  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor vermittelten TRPM3-Inhibition. Eine Involvement von  $G\alpha$ -Untereinheiten konnte hingegen ausgeschlossen werden, da eine Überexpression von konstitutiv aktiven  $G\alpha_i$ - und  $G\alpha_o$ -Untereinheiten keinerlei Inhibition zu induzieren vermochte und mSIRK (das nur die  $\beta\gamma$ -Untereinheiten freisetzt, ohne  $G\alpha$ -Untereinheiten zu aktivieren) eine starke Reduktion der PS-Antwort induziert. Auf welche Art und Weise die  $\beta\gamma$ -Untereinheiten die TRPM3-Hemmung vermitteln, ist jedoch weiterhin völlig unklar. Zum einen ist eine direkte Interaktion von  $\beta\gamma$  mit dem Kanal denkbar, wie sie beispielweise bereits für GIRK2-Kanäle gezeigt werden konnte [Whorton & MacKinnon 2013], zum anderen besteht die Möglichkeit, dass innerhalb des Signalweges noch weitere Komponenten zwischengeschaltet sind, die nach Aktivierung durch  $\beta\gamma$  die eigentliche Kanal-Inhibition vermitteln.

#### **4.12 Die TRPM3-Inhibition ist unabhängig von der $PIP_2$ -Konzentration und der PKC-Aktivität**

Falls keine direkte Interaktion vorliegen sollte, so müsste es mindestens einen dazwischengeschalteten Effektor geben, der nach Aktivierung (oder möglicherweise Hemmung) die eigentliche Inhibition der Kanäle vermittelt. Ein besonders vielversprechender Kandidat ist die Phospholipase  $\beta_2$  ( $PLC\beta_2$ ). Es existieren im Säuger genom vier  $PLC\beta$  Gene, die für Proteine codieren, die überwiegend durch  $G\alpha$ -Untereinheiten der  $G\alpha_q$ -Familie,  $\beta\gamma$ -Untereinheiten und durch  $Ca^{2+}$  aktiviert werden. Die Isoformen unterscheiden sich bezüglich ihrer Gewebe- und Zellverteilung, wobei in der Regel mehrere Isoformen in einem Zelltyp exprimiert werden. Am stärksten werden die  $PLC\beta$ 's durch  $G\alpha_q$ -Untereinheiten aktiviert, aber  $PLC\beta_1$ ,  $PLC\beta_2$  und  $PLC\beta_3$  werden auch durch  $\beta\gamma$ -Untereinheiten stimuliert. Die  $PLC\beta_2$  Isoform zeigt dabei die größte Sensitivität gegenüber  $\beta\gamma$ -Untereinheiten [Kadamur & Ross 2013].

Folglich wäre es denkbar, dass die durch Aktivierung von  $\alpha_2$ -Adrenorezeptoren freigesetzten  $\beta\gamma$ -Untereinheiten die  $PLC\beta_2$  (oder eine andere  $\beta\gamma$ -sensitive Isoform) aktivieren und dies letztendlich zu einer Inhibition der TRPM3-Aktivität führt. Wie bereits erwähnt ist die PLC in der Lage,  $PIP_2$  zu spalten und auf diese Weise  $IP_3$  und DAG zu produzieren. Die Inhibition könnte somit: (1) durch eine Abnahme der  $PIP_2$ -Konzentration in der Plasmamembran verursacht werden, (2) direkt durch  $IP_3$  bzw. DAG vermittelt werden oder (3) durch eine DAG-bedingte Aktivierung der PKC



**Abbildung 4-25: Noradrenalin induziert weder einen messbaren Abbau von PIP<sub>2</sub> noch eine messbare Produktion von DAG in der Plasmamembran.** TIRF-Experimente wurden in Ins1 Zellen und HEK-M3 Zellen durchgeführt. Gezeigt wird das aus allen Messungen gemittelte jeweilige TIRF-Fluoreszenzsignal ( $F_{TIRF}$ ) abzüglich des basalen (gemittelt aus den ersten 19 Messpunkten) TIRF-Fluoreszenzsignals ( $F_0$ ). In allen Messungen wurde 1  $\mu$ M Noradrenalin und 20  $\mu$ M Oxotremorin-M (OxoM) appliziert. (A, B) Ins1 Zellen wurden entweder mit dem PIP<sub>2</sub>-Sensor (PLC $\delta$ 1-PH) (A) oder dem DAG-Sensor (PKC $\gamma$ C1) (B) transient transfiziert. (C) HEK-M3 Zellen wurden transient mit  $\alpha_{2A}$ -Adrenorezeptoren, muskarinischen M1-Rezeptoren und dem DAG-Sensor (PKC $\gamma$ C1) transfiziert. (D) Statistik zu A. (E) Statistik zu B. (F) Statistik zu C.

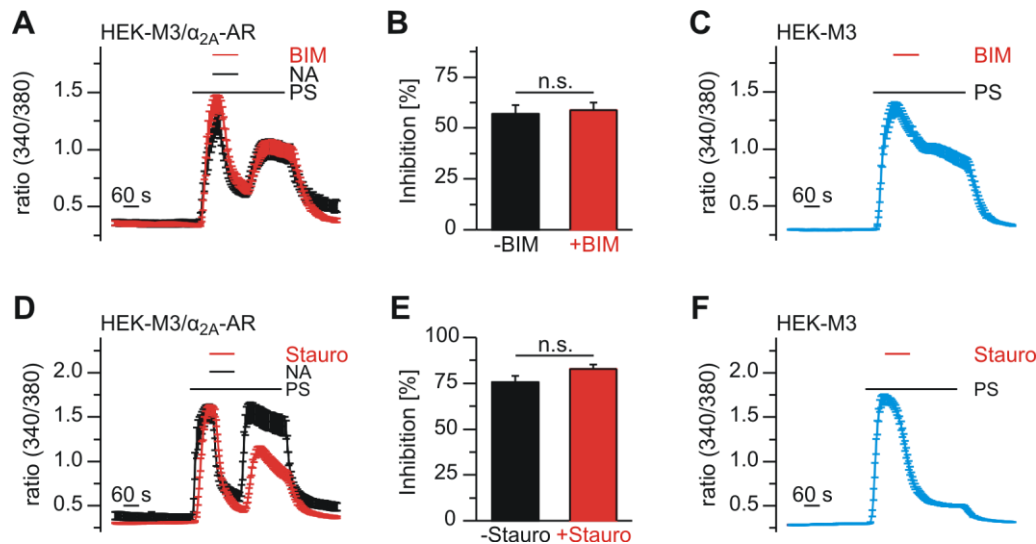
eingeleitet werden. Würde eines dieser Szenarien zutreffen, so sollte man in Zellen, die den  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor exprimieren, nach Noradrenalin-Applikation eine Abnahme der PIP<sub>2</sub>-Konzentration bzw. eine Zunahme der DAG-Konzentration in der Plasmamembran detektieren können.

Nachfolgend wurden deshalb TIRF-Experimente mit einem PIP<sub>2</sub>-Sensor (PLC $\delta$ 1-PH) und einem DAG-Sensor (PKC $\gamma$ C1) durchgeführt. Beide Sensoren waren EGFP gekoppelt und zeigten nach Anregung mit 488 nm eine Emission bei 509 nm. Im unstimulierten Zustand ist die PIP<sub>2</sub>-Konzentration in der Plasmamembran relativ hoch und viele Moleküle des PIP<sub>2</sub>-Sensors können PIP<sub>2</sub> an der Plasmamembran binden. Dementsprechend ist das TIRF-Fluoreszenzsignal des PIP<sub>2</sub>-Sensors in diesem Zustand relativ hoch. Kommt es nun zu einem Abbau von PIP<sub>2</sub>, kann der Sensor nicht mehr an die Plasmamembran binden und diffundiert von der Plasmamembran weg. Die Folge ist eine Abnahme des TIRF-Signals. Im Fall des DAG-Sensors verhält es sich genau umgekehrt. Im unstimulierten Zustand befindet sich nur wenig oder kein DAG in der Plasmamembran und der DAG-Sensor kann nicht an die Plasmamembran binden. Folglich liegt nur eine geringe TIRF-Fluoreszenz vor. Wird nun aber der PIP<sub>2</sub>-Abbau und

damit die Entstehung von DAG induziert, kann der DAG-Sensor an die Plasmamembran binden und die TIRF-Fluoreszenz steigt. In Ins1 Zellen, die mit dem PIP<sub>2</sub>-Sensor transient transfiziert wurden, zeigte sich nach Applikation von Noradrenalin (1 µM) keine Erniedrigung des TIRF-Fluoreszenzsignals. Nach Applikation des nichtselektiven muskarinischen Acetylcholinrezeptor Agonisten Oxotremorin-M (20 µM) hingegen war eine starke und reversible Abnahme des Signals zu detektieren (Abb. 4-25 A und D). Auch in Ins1 Zellen, die transient mit dem DAG-Sensor transfiziert wurden, bewirkte eine Noradrenalin-Applikation keine signifikante Änderung des TIRF-Signals. Oxotremorin-M dagegen induzierte einen starken Anstieg des TIRF-Fluoreszenzsignals (Abb. 4-25 B und E). Auch in HEK-M3 Zellen, die mit  $\alpha_{2A}$ -Adenorezeptoren, muskarinischen M1-Rezeptoren und dem DAG-Sensor transient transfiziert wurden, kam es nur nach Oxotremorin-M-Applikation zu einem Anstieg der Fluoreszenz (4-25 C und F).

Aus den TIRF-Messungen lässt sich schlussfolgern, dass Noradrenalin nicht in der Lage ist (in Ins1 Zellen und im heterologen Überexpressionssystem), einen detektierbaren Abbau von PIP<sub>2</sub> bzw. eine Produktion von DAG zu induzieren. Somit ist es unwahrscheinlich, dass der Noradrenalin-Effekt durch eine Verminderung der PIP<sub>2</sub>-Konzentration in der Plasmamembran bzw. durch Produktion von DAG vermittelt wird. Auch eine Rolle von IP<sub>3</sub> kann als unwahrscheinlich angesehen werden, da IP<sub>3</sub> proportional zu DAG gebildet wird. Da jedoch nach Noradrenalin-Applikation keine Entstehung von DAG detektiert wurde, sollte auch kein IP<sub>3</sub> gebildet werden. Es kann natürlich nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass ein geringer, mit den verwendeten Translokationssensoren undetektierbarer PIP<sub>2</sub>-Abbau nach Noradrenalin-Applikation induziert wird.

Da Noradrenalin keine messbare Steigerung der DAG-Konzentration in der Plasmamembran induziert, ist eine Rolle der PKC an der  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor vermittelten TRPM3-Inhibition eher unwahrscheinlich. Um jedoch eine Beteiligung der PKC gänzlich ausschließen zu können, wurden zusätzlich noch Experimente mit PKC Inhibitoren durchgeführt. Es wurden die nichtselektiven PKC-Inhibitoren Bisindolylmaleimid IV (BIM) und Staurosporin (Stauro) verwendet [Wu-Zhang & Newton 2013]. Aus Abbildung 4-26 A und B ist ersichtlich, dass die Co-Applikation von BIM zu keiner Verminderung der TRPM3-Hemmung nach Noradrenalin-Applikation



**Abbildung 4-26: Die pharmakologische Inhibition der PKC kann die Noradrenalin-bedingte Hemmung der TRPM3-Aktivität nicht aufheben.**  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging Experimente wurden mit HEK-M3 Zellen durchgeführt. Die jeweiligen Substanzen wurden in folgenden Konzentrationen appliziert: 50  $\mu\text{M}$  PS, 100 nM Noradrenalin, 1  $\mu\text{M}$  Staurosporin (Stauro), 1  $\mu\text{M}$  Bisindolylmaleimid IV (BIM). Messungen wurden entweder mit untransfizierten HEK-M3 Zellen (C und F) oder HEK-M3 Zellen, die transient mit dem  $\alpha_{2A}$ -Adrenorezeptor transfiziert wurden (A, B, D und E), durchgeführt. (A) Die rote Kurve zeigt Messungen mit zusätzlicher BIM-Applikation ( $n=34$ ). Die schwarze Kurve zeigt Kontrollmessungen ohne BIM-Applikation ( $n=29$ ). (B) Statistische Auswertung der in A dargestellten Messungen. (C) Untransfizierte HEK-M3 während PS- und BIM-Applikation ( $n=35$ ). (D) Die rote Kurve zeigt Messungen mit zusätzlicher Staurosporin-Applikation ( $n=37$ ). Die schwarze Kurve zeigt Kontrollmessungen ohne Staurosporin-Applikation ( $n=14$ ). (E) Statistische Auswertung der in D dargestellten Messungen. (F) Untransfizierte HEK-M3 während PS- und Staurosporin-Applikation ( $n=38$ ).

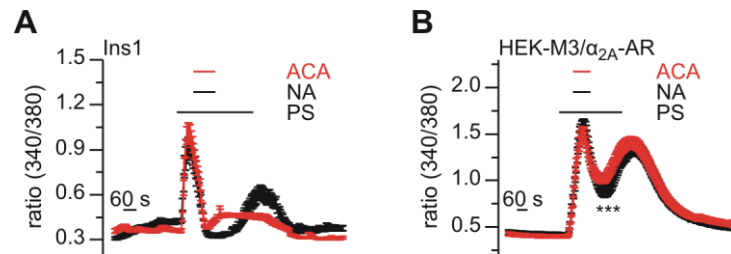
führt. Auch Staurosporin (Abb. 4-26 D und E) kann die durch Noradrenalin induzierte Hemmung der TRPM3-Aktivität nicht abschwächen. Messungen mit untransfizierten HEK-M3 Zellen zeigten jedoch, dass Staurosporin selbst einen nichtreversiblen, inhibitorischen Effekt auf TRPM3 ausübt. Dies erklärt auch, warum in Abbildung 4-26 D nach Auswaschen von Noradrenalin und Staurosporin das Fura-2-Signal deutlich niedriger war als in den Kontrollzellen. Somit kann aus den Experimenten mit Staurosporin keine eindeutige Erkenntnis gewonnen werden. Auch BIM zeigt einen leichten Effekt auf die TRPM3-Aktivität, allerdings war dieser viel schwächer und verfälschte die Ergebnisse nur geringfügig. Insofern zeigten die Experimente mit BIM, dass die Noradrenalin-bedingte Hemmung der TRPM3-Aktivität nicht über die PKC vermittelt wird. Dies deckt sich mit den Daten der TIRF-Experimente, die bereits zeigten, dass nach Noradrenalin-Applikation kein DAG gebildet wird, das wiederum für eine Aktivierung der PKC notwendig wäre. Außerdem zeigten die Patch-Clamp



Experimente mit AMP-PNP in der Pipettenlösung, dass der Signalweg unabhängig von ATP verbrauchenden Kinasen ist (siehe Abb. 4-15).

#### **4.13 Die Inhibition der TRPM3-Aktivität durch Noradrenalin wird nicht durch PLA<sub>2</sub> vermittelt.**

Ein weiteres Zielprotein von  $\beta\gamma$ -Untereinheiten sind die Phospholipasen A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). Dabei handelt es sich um ubiquitäre Enzyme, die in den meisten Zellen und Geweben zu finden sind. Die Phospholipasen A<sub>2</sub> können grob in cytosolische und sezernierte PLA<sub>2</sub> eingeteilt werden, wobei nur die cytosolischen Isoformen für den hier untersuchten Signalweg von Relevanz sind. Die Hydrolyse von zellulären Phospholipiden nach Aktivierung der PLA<sub>2</sub> führt zu einer Bildung von freien Fettsäuren, wie der Arachidonsäure. Arachidonsäure stellt eine Vorstufe vieler entzündungsfördernder Mediatoren dar, die genau wie die Arachidonsäure selbst wiederum als intrazelluläre Messenger fungieren können [Kramer & Sharp 1997; Harteneck et al. 2007]. Eine Aktivierung der PLA<sub>2</sub> durch  $\beta\gamma$ -Untereinheiten konnte in der Rinderretina gezeigt werden. Isolierte Photorezeptor-Außensegmente wurden dabei mit aufgereinigten  $\beta\gamma$ -Untereinheiten des Transducin inkubiert und eine gesteigerte Produktion von Arachidonsäure konnte detektiert werden [Jelsema & Axelrod 1987]. Weiterhin wurde gezeigt, dass  $\alpha_2$ -Adrenorezeptoren in der Lage sind, die PLA<sub>2</sub> zu stimulieren und so die Arachidonsäureproduktion anzuregen [Audubert et al. 1999]. Um eine Involvierung der cytosolischen PLA<sub>2</sub> bei der durch Noradrenalin vermittelten Inhibition der TRPM3-Aktivität zu untersuchen, wurde der PLA<sub>2</sub>-Inhibitor N-(p-Amylcinnamoylanthranicilsäure (ACA) verwendet [Harteneck et al. 2007]. Sollte die PLA<sub>2</sub> ein integraler Bestandteil des Signalwegs sein, so sollte deren Inhibition die  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor vermittelte TRPM3-Inhibition aufheben oder zumindest stark abschwächen. In Ins1 Zellen konnte die ACA (20  $\mu$ M) Co-Applikation die schnelle, Noradrenalin-bedingte Inhibition nicht verhindern, jedoch stieg, noch während Noradrenalin appliziert wurde, das Ca<sup>2+</sup>-Signal wieder an und verblieb dann auf einem relativ konstanten Niveau. Auch nach Auswaschen von Noradrenalin und ACA erreichte das Fura-2-Signal nicht die gleiche Höhe wie im Vergleich Kontrollzellen ohne ACA Applikation (Abb. 4-27 A). Im heterologen Überexpressionssystem zeigten die ACA behandelten Zellen eine kleine, aber dennoch signifikante Reduktion der  $\alpha_2$ -



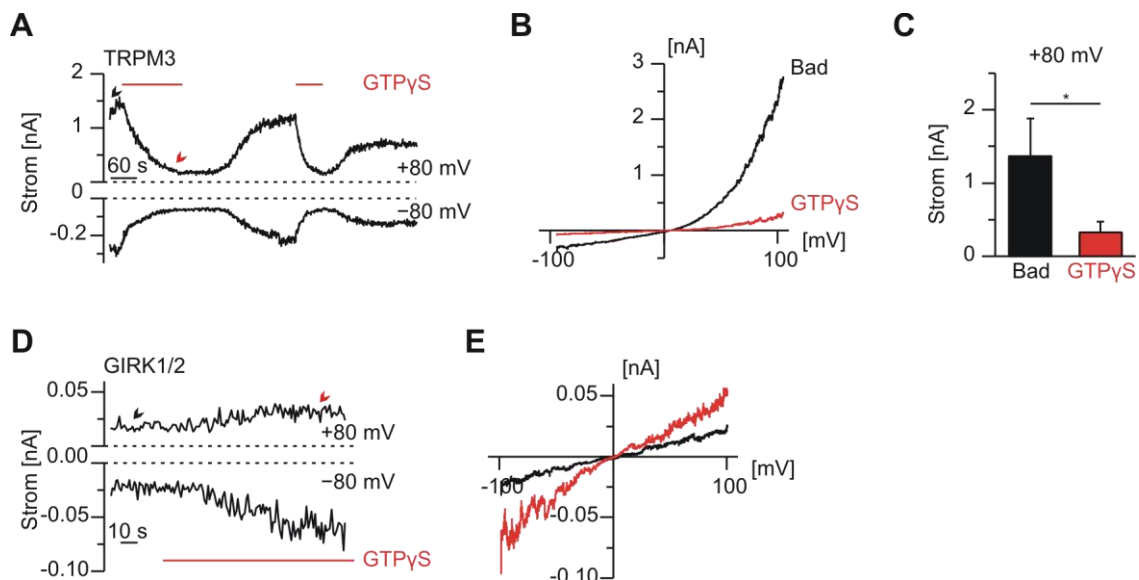
**Abbildung 4-27: Hemmung der PLA<sub>2</sub> hat nur einen geringfügigen Einfluss auf die  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor induzierte Hemmung der TRPM3-Aktivität.** Ca<sup>2+</sup>-Imaging Experimente wurden in Ins1 Zellen und HEK-M3 Zellen durchgeführt, die transient mit dem  $\alpha_{2A}$ -Adrenorezeptor transfiziert wurden. Rote Kurven zeigen Messungen mit zusätzlicher N-(p-Amylcinnamoyl)-anthranicilsäure-Applikation (ACA; 20  $\mu$ M). Kontrollmessungen ohne ACA-Stimulierung sind in schwarz dargestellt. In allen Messungen wurde 50  $\mu$ M PS und 100 nM Noradrenalin appliziert. **(A)** Mit ACA: n=38; Ohne ACA: n=19. **(B)** Mit ACA: n=57; Ohne ACA: n=38.

Adrenorezeptor vermittelten TRPM3-Inhibition (Abb. 4-27 B). Es hat den Anschein, als ob die Hemmung der PLA<sub>2</sub> einen gewissen Einfluss auf die Noradrenalin-bedingte Hemmung der TRPM3-Aktivität hat. In Ins1 Zellen ist der Effekt jedoch nur schwer zu interpretieren. Da der Effekt zumindest im heterologen Überexpressionssystem jedoch äußerst klein war, ist es unwahrscheinlich, dass die PLA<sub>2</sub> ein Schlüsselenzym des Signalwegs ist. Dennoch scheint die PLA<sub>2</sub> Aktivität möglicherweise einen Einfluss auf TRPM3 auszuüben.

Um eine Involvierung der cytosolischen PLA<sub>2</sub> bzw. weiterer cytosolischer Komponenten sicher ausschließen zu können, wurden im Folgenden Giant-Excised Patch-Clamp Experimente durchgeführt.

#### 4.14 Die G-Protein vermittelte Inhibition der TRPM3-Aktivität ist unabhängig von cytosolischen Komponenten

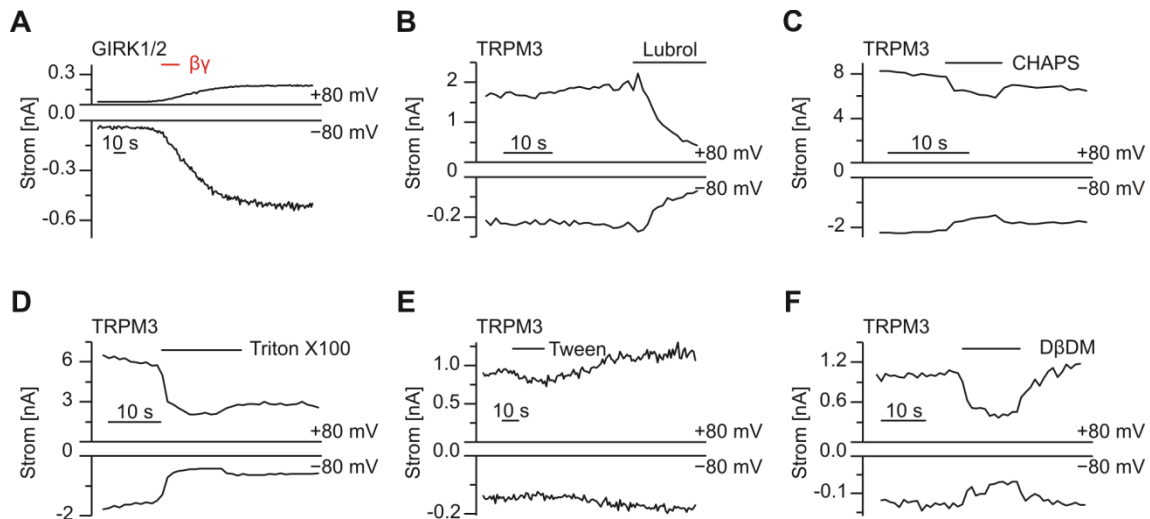
Um zu klären, ob cytosolische Komponenten am Signalweg, der nach  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor Stimulation zu einer Hemmung der TRPM3-Aktivität führt, beteiligt sind, wurden Giant-Excised Patch-Clamp Experimente mit *Xenopus laevis* Oocyten durchgeführt. Bei dieser Methode handelt es sich im Prinzip um Inside-Out Messungen. Aufgrund der Größe des Patches ist man jedoch in der Lage makroskopisch große Ströme (im nA-Bereich) zu messen. Nachdem der Membranpatch aus der Zelle herausgerissen wurde, ist die cytosolische Seite der Plasmamembran der Badlösung ausgesetzt, und das gesamte Cytosol, samt allen Proteinen wird ausgewaschen und durch die entsprechende Badlösung ersetzt. An der Membran



**Abbildung 4-28: Applikation von GTP $\gamma$ S in Giant-Excised-Patch Experimenten führt zu einer Inhibition der TRPM3-Aktivität.** Experimente wurden mit *Xenopus laevis* Oocyten durchgeführt, die entweder mit TRPM3 $\alpha$ 2 oder GIRK1/2 cRNA injiziert wurden. In allen Experimenten wurde 200  $\mu$ M GTP $\gamma$ S auf die cytosolische Seite der Plasmamembran appliziert. Bei den Experimenten mit TRPM3 befand sich zusätzlich 50  $\mu$ M PS in der Pipettenlösung. **(A)** Beispielmessung mit einer TRPM3 exprimierenden Oocyte. **(B)** Strom-/Spannungskurve zu der in A gezeigten Messung. Die Pfeilköpfe in A zeigen die entnommenen Messpunkte. Die schwarze Kurve zeigt den TRPM3-Strom während Applikation von Badlösung und die rote Kurve zeigt den gemessenen Strom während GTP $\gamma$ S-Applikation. **(C)** Statistische Auswertung zu Messungen wie in A dargestellt (n=8). **(D)** Beispielmessung mit einer GIRK1/2 exprimierenden Oocyte. **(E)** Strom-/Spannungskurve zu der in D gezeigten Messung. Die Pfeilköpfe in D zeigen die entnommenen Messpunkte. Die schwarze Kurve zeigt den gemessenen Strom während Applikation von Badlösung und die rote Kurve den gemessenen Strom während Applikation von GTP $\gamma$ S.

verbleiben lediglich integrale Membranproteine und solche, die auf die eine oder andere Weise mit der Plasmamembran oder einem dort befindlichen Zielprotein interagieren.

Für GIRK1/2 Kanäle konnte gezeigt werden, dass in Giant-Excised Patch-Clamp Experimenten eine Aktivierung der in Oocyten endogen vorkommenden G-Proteine durch GTP $\gamma$ S eine Aktivierung der GIRK Kanälen nach sich zieht [Chuang et al. 1998]. Folglich sollte in Oocyten, die TRPM3 exprimieren, eine GTP $\gamma$ S-Applikation (auf die Innenseite der Membran) eine Inhibition der TRPM3-Aktivität induzieren. Zunächst wurde überprüft, ob eine Aktivierung von GIRK1/2 Kanälen durch GTP $\gamma$ S reproduzierbar ist.



**Abbildung 4-29: Detergenzien hemmen die TRPM3-Aktivität.** Giant-Excised-Patch Experimenten wurden mit *Xenopus laevis* Oocyten durchgeführt, die entweder mit TRPM3 $\alpha$ 2 oder GIRK1/2 cRNA injiziert wurden. (A) Beispielmessung mit GIRK1/2 exprimierender Oocyte. By-Untereinheiten wurden in einer Konzentration von ca. 100 nM mit Hilfe eines Picospritzers appliziert. (B-F) Beispielmessungen mit TRPM3 $\alpha$ 2 exprimierenden Oocyten, bei denen verschiedene Detergenzien appliziert wurden. Detergenzien waren in folgenden Konzentrationen in der Badlösung gelöst: (B) 0,01 % Lubrol; (C) 0,01 % CHAPS; (D) 0,01 % Triton X100; (E) 0,01 % Tween; (F) 0,001 % Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid.

Abbildung 4-28 D zeigt eine Giant-Excised Patch-Clamp Messung mit Oocyten, denen 72 h zuvor die GIRK1/2 cRNA injiziert wurde. Die Applikation von 200  $\mu$ M GTP $\gamma$ S führte zu einer langsamen Entwicklung von Einwärts- und Auswärtsströmen. Dies lässt sich so interpretieren, dass durch GTP $\gamma$ S endogene G-Proteine aktiviert werden können. Um die TRPM3-Aktivität zu untersuchen, wurden die Oocyten mindestens 48 h vor den eigentlichen Messungen mit TRPM3 $\alpha$ 2 cRNA injiziert. Während der Messungen befand sich 50  $\mu$ M PS in der Pipettenlösung, um die TRPM3-Kanäle zu aktivieren. Abbildung 4-28 A-C zeigt, dass die Applikation von GTP $\gamma$ S (200  $\mu$ M) auf die cytosolische Seite der Membran zu einer starken und reversiblen Inhibition der TRPM3-Aktivität führte. Bis der Strom nach GTP $\gamma$ S-Applikation wieder anstieg, vergingen teilweise deutlich mehr als eine Minute. Bei GTP $\gamma$ S handelt es sich zwar um ein nicht hydrolysierbares GTP-Analogon, es konnte jedoch mittlerweile gezeigt werden, dass die Bindung von GTP $\gamma$ S an die G $\alpha$ -Untereinheiten kein irreversibler Vorgang ist und sich GTP $\gamma$ S nach einiger Zeit wieder von den G $\alpha$ -Untereinheiten lösen kann [Quirk et al. 2007]. Dies könnte die reversible TRPM3-Hemmung erklären.

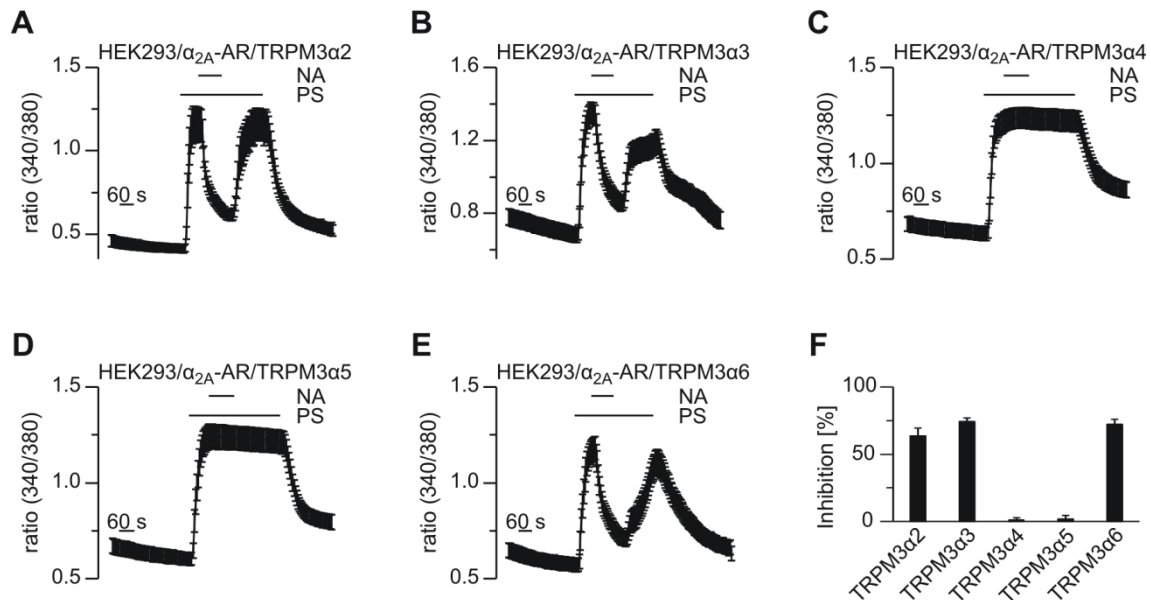
Diese Experimente zeigen, dass auch ohne cytosolische Komponenten eine Aktivierung von G-Proteinen eine starke Hemmung der TRPM3-Aktivität nach sich zieht. Da GTP $\gamma$ S

nicht nur eine Freisetzung von  $\beta\gamma$ -Untereinheiten bewirkt sondern auch die  $G\alpha$ -Untereinheiten aktiviert, wurde in den nächsten Experimenten versucht, aufgereinigte  $\beta\gamma$ -Untereinheiten direkt auf die cytosolische Seite der Plasmamembran zu applizieren, um so die TRPM3-Aktivität zu induzieren.

Anfängliche Kontrollmessungen mit GIRK1/2 exprimierenden Oocyten waren auch äußerst vielversprechend. Abbildung 4-29 A zeigt, dass die Applikation von  $\sim 100$  nM  $\beta\gamma$  auf die cytosolische Seite der Plasmamembran eine starke Aktivierung von GIRK1/2 Strömen induzierte. Die verwendeten  $\beta\gamma$ -Untereinheiten wurden käuflich von Calbiochem erworben. Es handelte sich dabei um aufgereinigte  $\beta\gamma$ -Untereinheiten aus Rinderhirnen. Die  $\beta\gamma$ -Untereinheit wurde in einer Lösung geliefert, die 1 % des Detergenz Lubrol enthielt. In Kontrollmessungen Abb. 4-29 B zeigte sich jedoch, dass bereits 0,01 % Lubrol TRPM3 irreversibel hemmten. Daraufhin wurde versucht, die  $\beta\gamma$ -Untereinheiten zu fällen und in Detergenzien-freier Badlösung zu resuspendieren. Es zeigte sich jedoch leider, dass die  $\beta\gamma$ -Untereinheiten (ohne Detergenz in der Lösung) nicht mehr funktionell waren. So aufgereinigte  $\beta\gamma$ -Untereinheiten waren nicht mehr in der Lage, GIRK1/2 Ströme zu induzieren. Daraufhin wurde nach einem geeigneten Detergenz gesucht, durch das man Lubrol ersetzen könnte. Alle getesteten Detergenzien zeigten jedoch genau wie Lubrol bereits eine mehr oder weniger starke inhibitorische Wirkung auf TRPM3 (Abb. 4-29 C-F). Insofern ist eine Durchführung der geplanten Experimente äußerst schwierig. Zunächst müsste langwierig getestet werden, bei welcher Detergenzkonzentration (z.B. Chaps; wird normalerweise bei vergleichbaren Experimenten in einer Konzentration von 0,01 % (oder höher) eingesetzt) ein minimaler inhibitorischer Effekt induziert wird, die Konzentration aber noch ausreichend ist, um die Funktionalität der  $\beta\gamma$ -Untereinheiten zu gewährleisten.

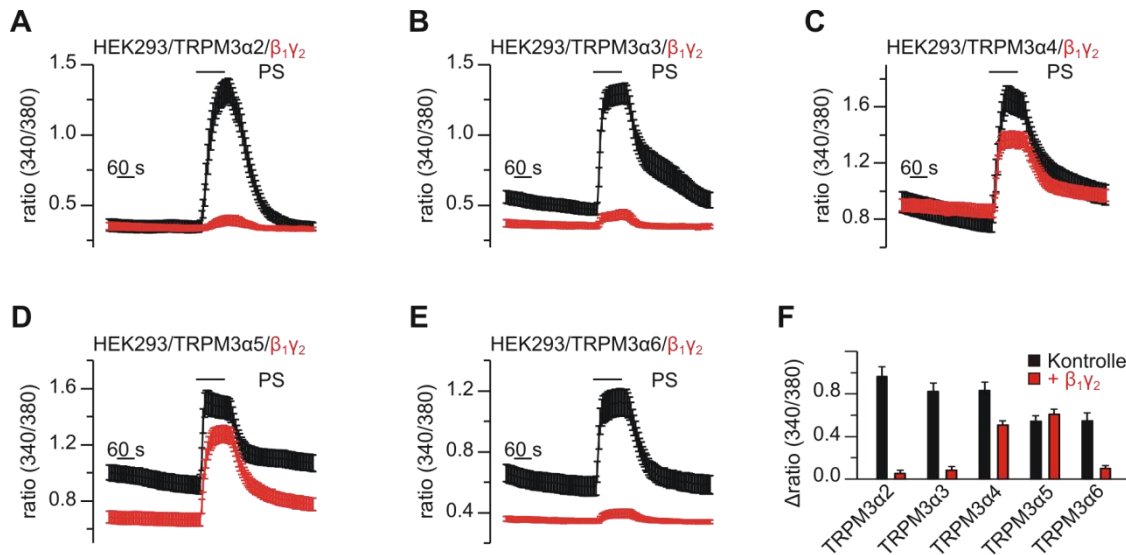
#### **4.15 Der Noradrenalin- und $\beta\gamma$ -Effekt auf TRPM3 ist Spleißvarianten spezifisch**

In der bisherigen Arbeit wurde nur die Wirkung von Noradrenalin auf die Spleißvariante TRPM3 $\alpha$ 2 untersucht. Wie bereits beschrieben, existieren jedoch mehrere Spleißvarianten des TRPM3-Kanals, die sich teilweise deutlich in ihren biophysikalischen Eigenschaften unterscheiden (siehe Abb. 1-3). Es wäre also denkbar, dass sich die Spleißvarianten auch bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber Noradrenalin



**Abbildung 4-30: Nicht alle TRPM3-Spleißvarianten werden durch den  $\alpha_{2A}$ -Adrenorezeptor vermittelten Signalweg inhibiert.**  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging Experimente wurden mit HEK293 Zellen, die transient mit  $\alpha_{2A}$ -Adrenorezeptoren und einer Spleißvariante des TRPM3 (TRPM3 $\alpha$ 2, TRPM3 $\alpha$ 3, TRPM3 $\alpha$ 4, TRPM3 $\alpha$ 5 oder TRPM3 $\alpha$ 6) transfiziert wurden, durchgeführt. In allen Messungen wurden 50  $\mu$ M PS und 100 nM Noradrenalin appliziert. (A) TRPM3 $\alpha$ 2: n=25. (B) TRPM3 $\alpha$ 3: n=63. (C) TRPM3 $\alpha$ 4: n=75. (D) TRPM3 $\alpha$ 5: n=63. (E) TRPM3 $\alpha$ 6: n=65. (F) Statistische Auswertung der in A-E gezeigten Experimente.

unterscheiden. Um dies zu untersuchen, wurden HEK293 Zellen transient mit verschiedenen TRPM3-Spleißvarianten (TRPM3 $\alpha$ 2, TRPM3 $\alpha$ 3, TRPM3 $\alpha$ 4, TRPM3 $\alpha$ 5 oder TRPM3 $\alpha$ 6 [Oberwinkler et al. 2005; Frühwald et al. 2012]) und  $\alpha_{2A}$ -Adrenorezeptoren transfiziert und in  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging Experimenten hinsichtlich der  $\alpha_{2A}$ -Adrenorezeptoren vermittelten Hemmung der TRPM3-Aktivität untersucht. Aus Abbildung 30 ist ersichtlich, dass die TRPM3 $\alpha$ 2-, TRPM3 $\alpha$ 3- und TRPM3 $\alpha$ 6-Aktivität nach Noradrenalin-Applikation stark und reversibel gehemmt wird (Abb. 4-30 A, B und E). Die Spleißvarianten TRPM3 $\alpha$ 4 und TRPM3 $\alpha$ 5 hingegen zeigten keinerlei Reduktion ihrer Aktivität, nachdem Noradrenalin co-appliziert wurde (Abb. 4-30 C und D). Die in Abbildung 4-30 F dargestellte statistische Übersicht veranschaulicht weiterhin den gravierenden Unterschied zwischen TRPM3 $\alpha$ 4 und TRPM3 $\alpha$ 5 und den übrigen getesteten Spleißformen des TRPM3. Um den möglichen Grund für die unterschiedliche Noradrenalin-Sensitivität besser zu verstehen, muss man die Exonabfolge der einzelnen Spleißvarianten genauer betrachten (siehe Abb. 1-3). Gemein ist den getesteten Varianten, dass ihnen allen sowohl Exon 2, als auch Exon 24 fehlt.



**Abbildung 4-31: Nicht alle TRPM3-Spleißvarianten zeigen eine Reduktion der PS-Antwort, wenn  $\beta_1\gamma_2$ -Untereinheiten überexprimiert werden.**  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging Experimente wurden mit HEK293 Zellen, die transient mit einer Spleißvariante des TRPM3 (TRPM3 $\alpha_2$ , TRPM3 $\alpha_3$ , TRPM3 $\alpha_4$ , TRPM3 $\alpha_5$  oder TRPM3 $\alpha_6$ ) und  $\beta_1\gamma_2$  (rote Kurven bzw. Balken) bzw. den entsprechenden Kontrollvektoren (schwarze Kurven bzw. Balken) transfiziert wurden, durchgeführt. In allen Messungen wurde 50  $\mu\text{M}$  PS appliziert. (A) TRPM3 $\alpha_2$  mit  $\beta_1\gamma_2$ : n=28; Kontrolle: n=22. (B) TRPM3 $\alpha_3$  mit  $\beta_1\gamma_2$ : n=40; Kontrolle: n=25. (C) TRPM3 $\alpha_4$  mit  $\beta_1\gamma_2$ : n=76; Kontrolle: n=36. (D) TRPM3 $\alpha_5$  mit  $\beta_1\gamma_2$ : n=72; Kontrolle: n=48. (E) TRPM3 $\alpha_6$  mit  $\beta_1\gamma_2$ : n=33; Kontrolle: n=34. (F) Statistische Auswertung der in A-E gezeigten Experimente. Dargestellt wird das jeweilig gemittelte Fura-2-Signal während PS-Applikation, abzüglich des basalen Signals vor Applikationsbeginn ( $\Delta\text{ratio (340/380)}$ ).

TRPM3 $\alpha_2$ -TRPM3 $\alpha_5$  fehlt weiterhin Exon 8, im Gegensatz zu TRPM3 $\alpha_6$ . TRPM3 $\alpha_2$ , TRPM3 $\alpha_5$  und TRPM3 $\alpha_6$  besitzen außerdem kein Exon 15. Alle bisher beschriebenen Exondeletionen kommen sowohl in Noradrenalin-sensitiven als auch unsensitiven TRPM3 Spleißvarianten vor und können deshalb nicht für die unterschiedlichen Sensitivitäten verantwortlich sein. TRPM3 $\alpha_4$  und TRPM3 $\alpha_5$  fehlt jedoch als einzigen (zumindest im Vergleich zu den getesteten Spleißformen) noch Exon 17, eine Sequenz von lediglich 10 Aminosäuren (PKALKLLGME). Insofern ist es äußerst wahrscheinlich, dass das Fehlen dieser 10 Aminosäuren dafür verantwortlich ist, dass die Kanäle ihre  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor vermittelte Noradrenalin-Sensitivität verlieren.

Die bisherige Arbeit lieferte solide Hinweise, dass die Noradrenalin-bedingte Hemmung der TRPM3-Aktivität durch  $\beta\gamma$ -Untereinheiten vermittelt wird. Somit sollten die Noradrenalin-unsensitiven Spleißvarianten (TRPM3 $\alpha_4$  und TRPM3 $\alpha_5$ ), wenn  $\beta\gamma$ -Untereinheiten überexprimiert werden, keine Reduktion der PS-Antwort zeigen. Um dies zu untersuchen, wurden HEK293 Zellen transient mit den verschiedenen TRPM3-

Spleißvarianten (TRPM3 $\alpha$ 2, TRPM3 $\alpha$ 3, TRPM3 $\alpha$ 4, TRPM3 $\alpha$ 5 oder TRPM3 $\alpha$ 6) und  $\beta_1\gamma_2$  (oder den entsprechenden Kontrollvektoren) transfiziert. Abbildung 4-31 zeigt, dass die Überexpression von  $\beta_1\gamma_2$  zu einer soliden Hemmung der TRPM3 $\alpha$ 2-, TRPM3 $\alpha$ 3- und TRPM3 $\alpha$ 6-Aktivität führt (Abb. 4-31 A, B und E). Völlig anders verhielt es sich hingegen bei Zellen, die mit TRPM3 $\alpha$ 4, TRPM3 $\alpha$ 5 transfiziert wurden. Die  $\beta\gamma$ -Überexpression führte zu keiner oder nur einer geringen Reduktion der PS-Antwort im direkten Vergleich zu Kontrollmessungen, in denen keine  $\beta\gamma$ -Untereinheiten exprimiert wurden (Abb. 4-31 C und E). Somit scheint ein Fehlen von Exon 17 bzw. der 10 Aminosäuren eine  $\beta\gamma$  vermittelte TRPM3-Inhibition unmöglich zu machen bzw. drastisch einzuschränken.

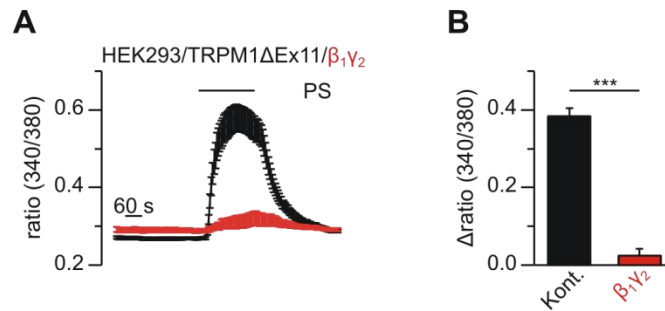
Die in Abbildung 4-30 und 4-31 präsentierten Daten zeigen eindeutig, dass die  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor vermittelte TRPM3-Hemmung bzw. die durch  $\beta\gamma$ -Überexpression induzierte Reduktion der PS-Antwort nur bei einigen TRPM3-Spleißformen (TRPM3 $\alpha$ 2, TRPM3 $\alpha$ 3 und TRPM3 $\alpha$ 6) beobachtet werden kann. Die Sensitivität scheint dabei über Exon 17 vermittelt zu werden, da die getesteten Spleißvarianten ohne dieses Exon (TRPM3 $\alpha$ 4 und TRPM3 $\alpha$ 5) keine Inhibition zeigten.

#### **4.16 Überexpression von $\beta\gamma$ -Untereinheiten führt zu einer Inhibition der TRPM1 $\Delta$ Ex11-Aktivität**

Bei TRPM1 handelt es sich um den nächsten Verwandten des TRPM3 innerhalb der TRP-Familie. Es konnte gezeigt werden, dass TRPM1 Ionen-leitende Kanäle bildet und wie TRPM3 durch PS aktiviert werden kann [Lambert et al. 2011]. TRPM1 mRNA wird unter anderem stark in einer Subpopulation von Bipolarzellen in der Retina exprimiert und es konnte gezeigt werden, dass dieser Kanal an der Lichtantwort in ON-Bipolarzellen beteiligt ist. Dabei scheint der Kanal durch den GPCR mGluR6 (in Dunkelheit: Photorezeptoren schütten Glutamat aus, das wiederum mGluR6 in On-Bipolarzellen aktiviert) inhibiert zu werden. Kürzlich wurde berichtet, dass diese Hemmung mittels  $\beta\gamma$ -Untereinheiten vermittelt wird [Shen et al. 2012].

Aufgrund der  $\beta\gamma$ -Sensitivität und der nahen Verwandtschaft zu TRPM3 stellte sich die Frage, ob die Proteinsequenz von TRPM1 ebenfalls die 10 Aminosäuren beinhaltet, die scheinbar für die  $\beta\gamma$ -Sensitivität von TRPM3 unerlässlich sind. Ein Sequenzalignment ([www.ch.embnet.org/software/LALIGN\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html)) der entsprechenden Protein-





**Abbildung 4-32: Überexpression von  $\beta_1\gamma_2$  führt zu einer verminderten TRPM1ΔEx11-Aktivität.** Ca<sup>2+</sup>-Imaging Experimente wurden mit HEK293 Zellen, die transient mit TRPM1ΔEx11 und  $\beta_1\gamma_2$  (rote Kurven bzw. Balken) bzw. den entsprechenden Kontrollvektoren (schwarze Kurven bzw. Balken) transfiziert wurden, durchgeführt. **(A)** Mit  $\beta_1\gamma_2$ : n=34. Kontrolle: n=259. **(B)** Statistische Auswertung der in A gezeigten Messungen. Die  $\Delta$ ratio (340/380) entspricht dem Fura-2-Signal während der PS-Applikation, abzüglich des basalen Signals vor Applikationsbeginn.

sequenz von TRPM3 und TRPM1 zeigte, dass diese Sequenz auch in TRPM1 (zumindest in den meisten Spleißvarianten) vollständig vorhanden ist. Um eine  $\beta\gamma$ -Sensitivität zu bestätigen, wurden im Folgenden Ca<sup>2+</sup>-Imaging Experimente mit HEK293 Zellen durchgeführt, die transient mit TRPM1ΔEx11 und  $\beta_1\gamma_2$  transfiziert wurden. Bei TRPM1ΔEx11 handelt es sich um eine TRPM1-Mutante, in der Exon 11 deletiert wurde, aber die relevanten 10 Aminosäuren weiterhin vorhanden sind. Diese TRPM1-Mutante zeigt deutlich größere Ströme als der Wildtyp-Kanal und ist daher experimentell leichter zu untersuchen [Lambert et al. 2011]. Abbildung 4-32 zeigt, dass Zellen, die neben TRPM1ΔEx11 zusätzlich mit  $\beta_1\gamma_2$  transient transfiziert wurden (rote Kurve, roter Balken), im Vergleich zu Zellen, die lediglich mit TRPM1ΔEx11 (und den entsprechenden Kontrollvektoren) transfiziert wurden (schwarze Kurve, schwarzer Balken), eine stark verminderte PS-Antwort aufweisen.

Diese Ergebnisse bekräftigen, dass TRPM1-Kanäle durch  $\beta_1\gamma_2$ -Untereinheiten inhibiert werden [Shen et al. 2012]. Um mit Sicherheit sagen zu können, dass die  $\beta\gamma$ -Sensitivität von TRPM1 auch durch die gleiche Aminosäuresequenz wie bei TRPM3 codiert wird, bedarf es jedoch noch weiterer Experimente.

Weiterhin ist anzumerken, dass  $\beta_1$  wahrscheinlich nicht in On-Bipolarzellen exprimiert wird [Huang et al. 2003] und somit nicht an der Signalkaskade (die letztendlich zu einer Hemmung von TRPM1 führt) beteiligt ist. Vielversprechende Kandidaten für die am Signalweg beteiligten  $\beta\gamma$ -Untereinheiten sind hingegen  $\beta_3$  und  $\gamma_{13}$ , die beide stark in On-Bipolarzellen exprimiert werden [Huang et al. 2003]. Außerdem konnte gezeigt

werden, dass eine Deletion von  $\beta_3$  zu einer starken Reduktion der normalen Lichtantwort führt [Dhingra et al. 2012]. Auch scheinen RGS7, RGS11 und deren Bindungspartner  $\beta_{5s}$  an der Signaltransduktionskaskade auf gewisse Weise beteiligt zu sein [Cao et al. 2009; Cao et al. 2012]

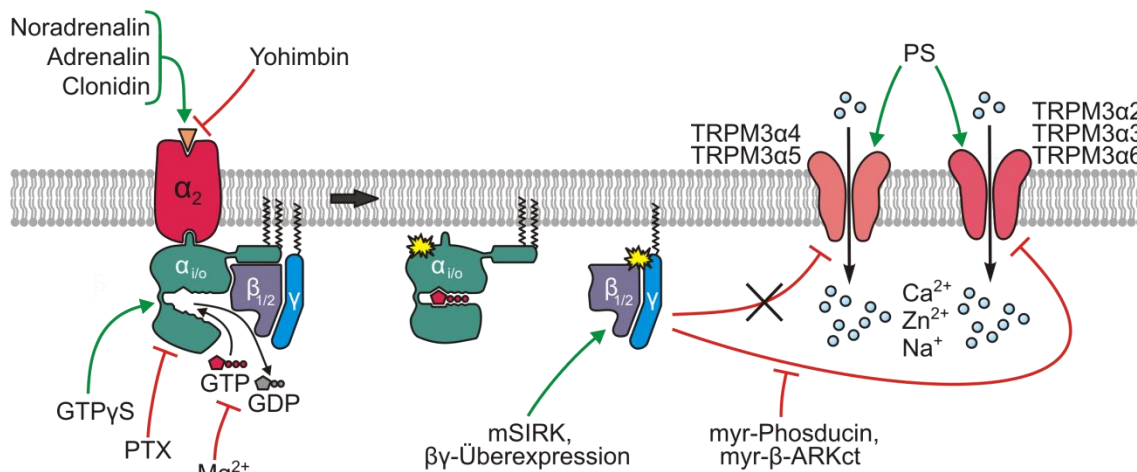
## 5. Diskussion

### 5.1 Diskussion und Interpretation der Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit liefert überzeugende Belege, dass die TRPM3-Aktivität in pankreatischen  $\beta$ -Zellen durch  $\alpha_2$ -Adrenorezeptoren inhibiert wird. Die Inhibition wird dabei über einen PTX-sensitiven,  $G\alpha_i$ -/ $G\alpha_o$ -gekoppelten Signalweg vermittelt. Als Mediator der Hemmung dienen dabei  $\beta\gamma$ -Untereinheiten, wohingegen aktive  $G\alpha$ -Untereinheiten nicht zur Hemmung beitragen. Die Inhibition ist unabhängig von der PKA-, PLC-, PKC- und PLA<sub>2</sub>-Aktivität. Weitere cytosolische Komponenten scheinen ebenfalls nicht an der TRPM3-Hemmung beteiligt zu sein. Die Inhibition konnte dabei nicht von allen  $\beta\gamma$ -Kombinationen vermittelt werden. Nur  $\beta_1$  und  $\beta_2$  (in Kombination mit  $\gamma$ -Untereinheiten) waren in der Lage, die TRPM3-Aktivität zu vermindern. Welche  $\gamma$ -Untereinheit co-exprimiert wurde, spielte keine Rolle. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass nur bestimmte TRPM3-Spleißvarianten durch  $\alpha_2$ -Adrenorezeptoren bzw.  $\beta\gamma$ -Untereinheiten gehemmt werden können. Die Sensitivität gegenüber der Inhibition scheint dabei von 10 Aminosäuren (Exon 17) abhängig zu sein. Abbildung 5-1 fasst die Erkenntnisse dieser Arbeit, bzw. den Signalweg, der zur Hemmung der TRPM3-Aktivität führt, zusammen.

Den ersten Hinweis über eine mögliche Regulation der TRPM3-Aktivität durch G-Protein vermittelte Signalwege lieferten Patch-Clamp Experimente mit GTP $\gamma$ S in der Intrazellulärlösung. Die intrazelluläre Applikation des unhydrolysierbaren GTP-Analogon führte zu einer fast vollständigen Abnahme des PS-induzierten Stroms, sowohl in Ins1 Zellen als auch in primären  $\beta$ -Zellen der Maus (Abb. 4-1).

Da  $\alpha_2$ -Adrenorezeptoren eine der bedeutsamsten Regulatoren der Insulinfreisetzung sind und eine Fülle von Effekten in pankreatischen  $\beta$ -Zellen induzieren [Straub & Sharp 2012], wurde untersucht, ob Noradrenalin bzw. eine Aktivierung von Adrenorezeptoren einen Einfluss auf die TRPM3-Aktivität in  $\beta$ -Zellen hat. Noradrenalin induzierte eine starke, reversible und anhaltende Hemmung der durch PS hervorgerufenen TRPM3-Aktivität, sowohl in Ins1 Zellen als auch in primären  $\beta$ -Zellen der Maus (Abb. 4-2 und 4-3). Adrenalin induzierte vergleichbare Effekte (Abb. 4-4). Bei Mäusen liegt die basale NoradrenalinKonzentration im Blutplasma bei etwa 4 nM [Grouzmann et al. 2003]. Bei dieser Konzentration erscheint eine TRPM3-Hemmung



**Abbildung 5-1: Die durch α<sub>2</sub>-Adrenorezeptoren-bedingte Inhibition von TRPM3 wird über βγ-Untereinheiten vermittelt.** Eine Aktivierung von Adrenorezeptoren durch Noradrenalin, Adrenalin oder des selektiven α<sub>2</sub>-Adrenorezeptor Agonisten Clonidin führt zu einer Hemmung der TRPM3-Aktivität. Eine gleichzeitige Applikation des selektiven α<sub>2</sub>-Adrenorezeptor Antagonisten Yohimbin verhindert diese Inhibition. Die TRPM3-Inhibition in β-Zellen konnte nur in Anwesenheit von intrazellulärem Mg<sup>2+</sup> beobachtet werden. Weiterhin konnte eine unspezifische Aktivierung von G-Proteinen durch intrazelluläre Applikation des unhydrolysierbaren GTP-Analogons GTPγS, eine starke Hemmung der TRPM3-Aktivität induzieren. Experimente mit Pertussis Toxin (PTX) zeigten weiterhin, dass es sich um einen Gα<sub>i</sub> bzw. Gα<sub>o</sub>-gekoppelten Signalweg handelt. Eine Inhibition der TRPM3-Aktivität konnte ebenfalls durch eine Überexpression von βγ-Untereinheiten herbeigeführt werden. Dabei waren nur β<sub>1</sub> und β<sub>2</sub> (in Kombination mit einer γ-Untereinheit) in der Lage, den Kanal zu hemmen. Ebenso konnte eine TRPM3-Hemmung mittels des membrangängigen Peptids mSIRK induziert werden. Ein Abfangen der βγ-Untereinheiten mittels βγ-Scavengern (myr-Phosducin und myr-β-ARKct) konnte die Noradrenalin-bedingte TRPM3-Inhibition hingegen abschwächen. Eine Überexpression von konstitutiv aktiven Gα<sub>i</sub> bzw. Gα<sub>o</sub>-Untereinheiten führte zu keiner Verminderung der TRPM3-Aktivität. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass nur bestimmte TRPM3-Spleißvarianten (TRPM3α2, TRPM3α3 und TRPM3α6) durch α<sub>2</sub>-Adrenorezeptoren bzw. βγ-Untereinheiten gehemmt werden können. Für einen Teil der Grafik wurde eine Abbildung von Rasmussen et al. (2011) in modifizierter Form verwendet

unwahrscheinlich. Unter Stressbedingungen kommt es jedoch zu einer sehr starken Erhöhung der Noradrenalkonzentration [Grouzmann et al. 2003]. Außerdem werden die pankreatischen Inseln von Mäusen direkt durch sympathische Bahnen innerviert und somit wird Noradrenalin in direkter Nähe der β-Zellen ausgeschüttet [Åhrén 2000; Taborsky 2010]. Daher ist davon auszugehen, dass die Konzentration (bei Sympathikus-Aktivität) in den Inseln relativ hohe Werte erreicht und von einer TRPM3-Hemmung ausgegangen werden kann.

Unter Ruhebedingungen liegt die Noradrenalkonzentration beim Menschen zwischen 0,1–3,1 nM [Strobel 2002]. Die Konzentration ist dabei stark abhängig von der

Tageszeit und der Körperposition. In stehender Position ist die Noradrenalin-konzentration um bis zu 150 % höher als in liegender. Extreme körperliche Belastung ist der stärkste physiologische Stimulus, der zu einer Aktivierung des sympathoadrenergen Systems führt und lässt die Konzentration von Noradrenalin um den Faktor 20–50 ansteigen. Somit werden unter extremer Belastung Konzentrationen von bis zu 100 nM erreicht [Strobel 2002]. Unter Stressbedingungen (auch ohne zusätzliche direkte sympathische Innervierung der  $\beta$ -Zellen [Rodriguez-Diaz et al. 2011]) werden also Noradrenalinkonzentrationen erreicht, die zu einer Inhibition von TRPM3 führen sollten. Insofern handelt es sich bei den in den Experimenten verwendeten Noradrenalinkonzentrationen um physiologische Konzentrationen unter Stressbedingungen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass bei Sympathikus-Aktivität die TRPM3-Kanäle in  $\beta$ -Zellen inhibiert werden.

Noradrenalin vermittelt seine Effekte durch Aktivierung von Adrenorezeptoren. Mit Hilfe pharmakologischer Experimente konnte geklärt werden, dass  $\alpha_2$ -Adrenorezeptoren die Hemmung der TRPM3-Aktivität vermitteln. Dabei induzierte der selektive  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor Agonist Clonidin eine vergleichbare Inhibition wie Noradrenalin und der  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor Antagonist Yohimbin war in der Lage, die Noradrenalin-bedingte Hemmung stark abzuschwächen (Abb. 4-6). Eine Aktivierung von  $\beta$ -Adrenorezeptoren durch Isoproterenol führte hingegen zu keiner Inhibition der TRPM3-Aktivität und eine Hemmung der  $\beta$ -Adrenorezeptoren durch Propranolol konnte den Noradrenalin-Effekt nicht abschwächen. Auch die Inhibition von  $\alpha_1$ -Adrenorezeptoren durch Prazosin schwächte die Inhibition nicht ab (Abb. 4-5). In HEK293 Zellen, die stabil TRPM3 exprimieren (HEK-M3-EYFP), jedoch endogen keine  $\alpha_2$ -Adrenorezeptoren besitzen [Atwood et al. 2011], induzierte Noradrenalin keine Reduktion der PS-Antwort (Abb. 4-2 D). Somit konnte auch ein direkter Effekt von Noradrenalin auf TRPM3-Kanäle ausgeschlossen werden. Experimente im heterologen Überexpressionssystem zeigten weiterhin, dass alle drei Isoformen des  $\alpha_2$ -Adrenorezeptors ( $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ ,  $\alpha_{2C}$ ) in der Lage sind, eine Inhibition der TPRM3-Aktivität zu vermitteln (Abb. 4-7). Für die Modulation der Insulinfreisetzung in  $\beta$ -Zellen scheinen jedoch lediglich die  $\alpha_{2A}$ - und  $\alpha_{2C}$ -Isoform relevant zu sein [Angel et al. 1990; Peterhoff et al. 2003; Fagerholm et al. 2004; Fagerholm et al. 2011; Straub & Sharp 2012]. Bei  $\alpha_2$ -Adrenorezeptoren handelt es sich um  $G\alpha_{i/o}$ -gekoppelte Rezeptoren. Dass auch die

Noradrenalin-bedingte Hemmung der TRPM3-Aktivität durch einen  $G\alpha_{i/o}$ -gekoppelten Signalweg vermittelt wird, zeigten Experimente mit PTX. In Zellen, die mit diesem Toxin behandelt wurden, hatte eine Noradrenalin-Applikation nahezu keinerlei Einfluss mehr auf die TRPM3-abhängige PS-Antwort (Abb. 4-9).

Die Inhibition von TRPM3 konnte jedoch nicht nur nach Stimulation von  $\alpha_2$ -Adrenorezeptoren beobachtet werden, sondern die Stimulierung von Somatostatin-Rezeptoren induzierte ebenfalls eine Inhibition (Abb. 4-10). Auch hier handelt es sich um einen zugrundeliegenden  $G\alpha_{i/o}$ -gekoppelten Mechanismus. Im heterologen Überexpressionssystem konnte weiterhin gezeigt werden, dass mGluR6, ein GPCR der endogen nicht in  $\beta$ -Zellen exprimiert wird, eine PTX sensitive TRPM3-Inhibition induzieren kann (Abb. 4-11).

Der klassische Signalweg von  $G\alpha_{i/o}$ -gekoppelten GPCR erfolgt über eine Inhibition der Adenylatcyclase und führt damit zu einer Verminderung der cytosolischen cAMP Konzentration, gefolgt von einer reduzierten PKA-Aktivität. Dieser Signalweg liegt der  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor vermittelten TRPM3-Hemmung wahrscheinlich jedoch nicht zugrunde. Weder die künstliche Erhöhung der cytosolischen cAMP-Konzentration mittels Forskolin bzw. IBMX (Abb. 4-12), noch die gleichzeitige Stimulation eines  $G\alpha_s$ -gekoppelten Signalwegs (Abb. 4-13) konnte der  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor-bedingten Hemmung der TRPM3-Aktivität entgegenwirken. Zu beachten ist bei diesen Experimenten jedoch, dass die cAMP-Konzentration während der Messungen nicht detektiert oder bestimmt wurde. Folglich wäre es möglich, dass die durch Forskolin und IBMX induzierte Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration durch die Noradrenalin-Applikation wieder aufgehoben wurde. Es konnte zumindest gezeigt werden, dass eine durch IBMX (100  $\mu$ M) induzierte Erhöhung der cAMP-Konzentration durch Applikation von Noradrenalin (in einer hohen Konzentration; 10  $\mu$ M) aufgehoben werden kann [Dyachok et al. 2006]. Im Falle von TRPM8, der PKA-abhängig durch  $\alpha_2$ -Adrenorezeptoren inhibiert wird, führte jedoch eine Applikation von Forskolin oder eine gleichzeitige Stimulation eines  $G\alpha_s$ -gekoppelten Signalwegs zu einer Aufhebung der TRPM8-Inhibition [Bavencoffe et al. 2010]. Unter Berücksichtigung dieser Tatsache erscheint eine Beteiligung von cAMP an der  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor-vermittelten TRPM3-Hemmung als unwahrscheinlich.

Forskolin bzw. Forskolin und IBMX induzierten, bereits alleine appliziert, einen Anstieg des Fura-2-Signals (Abb. 4-12 A und C), wobei der Effekt in Ins1 Zellen deutlich ausgeprägter zu beobachten war als in primären  $\beta$ -Zellen. Der Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration lässt sich mit einer PKA-bedingten Potenzierung der spannungsabhängigen L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle und der Inhibition von  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanälen erklären [Tengholm 2012]. Ein direkter Effekt von cAMP auf TRPM3 kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden.

Äußerst überraschend war, dass eine pharmakologische Inhibition der PKA zu einer Verminderung der TRPM3-Aktivität führte (Abb. 4-14). Dabei induzierte KT5720 eine nur sehr schwache Hemmung, H89 hingegen eine sehr starke. Diese Ergebnisse stehen im genauen Widerspruch zu den Erkenntnissen, die aus den Messungen mit Forskolin und IBMX gewonnen wurden. Würde die Inhibition von TRPM3 über eine verminderte PKA-Aktivität vermittelt werden, so würde man erwarten, dass eine Steigerung der cAMP-Produktion die Inhibition reduzieren würde. Eine Erhöhung der cAMP-Konzentration (Abb. 4-12 und 4-13) konnte jedoch die TRPM3-Hemmung nicht abschwächen. Dies spricht somit gegen eine Beteiligung der PKA am Signalweg. Dass die Noradrenalin vermittelte Inhibition nicht PKA abhängig ist, konnte in folgenden Experimenten gezeigt werden. Zum einen konnte keine Reduktion der TRPM3-Aktivität in Anwesenheit des unhydrolysierbaren ATP-Analogons AMP-PNP beobachtet werden (Abb. 4-15), und zum anderen konnte gezeigt werden, dass der TRPM3-Inhibition durch  $\alpha_2$ -Adrenorezeptoren ein membranbegrenzter Signalweg zugrunde liegt (Abb. 4-16). Würde der Noradrenalin-bedingte inhibitorische Effekt durch eine verminderte PKA-Aktivität vermittelt werden, so müsste man davon ausgehen, dass die TRPM3-Aktivität nur aufrechterhalten werden kann, wenn der Kanal durch die PKA an bestimmten Stellen phosphoryliert würde bzw. die PKA andere Effektoren phosphoryliert, die dann wiederum die Kanal-Aktivität sicherstellen. In diesem Szenario wäre ATP ein essentieller Co-Faktor, da die PKA ATP benötigt, um Zielproteine phosphorylieren zu können. Folglich würde in Patch-Clamp Messungen, in denen intrazelluläres ATP durch unhydrolysierbares AMP-PNP ausgetauscht wird, keine PKA-Aktivität mehr möglich sein und es zu einer Abnahme der TRPM3-Aktivität kommen. Dies ist jedoch nicht der Fall. In Messungen unter solchen Bedingungen war keinerlei Reduktion des TRPM3-Stroms zu beobachten (Abb. 4-15). Ein weiteres Argument

gegen eine Beteiligung der PKA lieferten die Experimente in der Cell-Attached-Konfiguration (Abb. 4-16). Hier zeigte sich, dass Noradrenalin nur eine Inhibition der TRPM3-Aktivität induzieren kann, wenn es sich zusammen mit PS in der Patch-Pipette befand. Eine Applikation von außen (Noradrenalin kann aufgrund des engen Kontaktes zwischen Pipette und Plasmamembran nicht in den Bereich des Patches gelangen) konnte keine Reduktion induzieren. Würde der Effekt durch cAMP bzw. die PKA vermittelt werden, würde man erwarten, dass Noradrenalin in beiden Fällen eine Inhibition induziert, da cAMP ein löslicher „second messenger“ ist und frei innerhalb und außerhalb des Patches diffundieren kann. Somit sprechen diese Ergebnisse gegen eine Beteiligung von cAMP und der PKA an der  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor vermittelten Inhibition von TRPM3.

Allerdings ist mittlerweile bekannt, dass die Änderung der cAMP-Konzentration stark abhängig ist von der Lokalisation und Verfügbarkeit des GPCR ( $G\alpha_i$ - oder  $G\alpha_s$ -gekoppelt), der Adenylatcyclase und der Phosphodiesterase und dass sich sogenannte cAMP-Mikrodomänen bilden, in denen sich die cAMP-Konzentration lokal stark von anderen Bereichen in der Zelle unterscheidet [Taskén & Aandahl 2004]. Sollte Noradrenalin nur eine lokale, stark räumlich begrenzte cAMP-Änderung induzieren, so würde bei einer Noradrenalin-Applikation außerhalb des Membranpatches womöglich die cAMP-Konzentration innerhalb des Patches kaum verändert werden.

Da jedoch die meisten der durchgeführten Ergebnisse relativ klar gegen eine Beteiligung von cAMP und der PKA an der Noradrenalin-bedingten TRPM3-Hemmung sprechen, ist es unwahrscheinlich, dass die  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor vermittelte Inhibition der TRPM3-Kanäle dem „klassischen“  $G\alpha_i$ -Signalweg folgt. Nichtsdestotrotz ist es denkbar, dass cAMP bzw. die PKA auf gewisse Weise und als Komponenten anderer Signalwege, die TRPM3-Kanäle modulieren können.

Eine Beteiligung von  $G\alpha_i$ - bzw.  $G\alpha_o$ -Untereinheiten an der TRPM3-Inhibition konnte ebenfalls weitgehend ausgeschlossen werden. Weder die Überexpression von Wildtyp  $G\alpha_i$ - bzw.  $G\alpha_o$ -Untereinheiten noch der konstitutiv-aktiven Varianten konnte eine deutliche Reduktion der TRPM3-Aktivität hervorrufen (Abb. 4-17). Im Gegensatz dazu zeigte die Überexpression von  $\beta\gamma$ -Untereinheiten eine drastische Verminderung der TRPM3-Aktivität (Abb. 4-18, 4-19, 4-20, 4-21). Besonders interessant ist dabei, dass nicht alle  $\beta\gamma$ -Kombinationen in der Lage waren, diese Inhibition zu induzieren. Nur



Kombinationen, die entweder  $\beta_1$  oder  $\beta_2$  beinhalteten, vermochten es, eine Inhibition zu vermitteln. Welche  $\gamma$ -Untereinheit dabei co-exprimiert wurde, schien jedoch keine Rolle zu spielen, da alle getesteten  $\gamma$ -Untereinheiten ( $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$ ,  $\gamma_4$ ,  $\gamma_5$ ,  $\gamma_7$  und  $\gamma_{13}$  in Kombination mit  $\beta_1$ ) vergleichbare Inhibitionen hervorriefen. Eine Co-Expression einer  $\gamma$ -Untereinheit war aber trotzdem essentiell für die volle Ausprägung des Effekts, da eine alleinige Überexpression von  $\beta_1$  oder  $\beta_2$  keinen oder nur einen geringfügigen Effekt hatte. Auch  $\beta_5$  ( $\beta_{5S}$  und  $\beta_{5L}$ ) zusammen mit RGS7 konnte keine Verminderung der TRPM3-Aktivität induzieren.  $\beta_5$  wurde zusammen mit RGS7 transfiziert, da gezeigt werden konnte, dass  $\beta_5$  im Gegensatz zu den übrigen  $\beta$ -Untereinheiten mit RGS-Proteinen komplexiert, dafür aber kaum mit  $\gamma$ -Untereinheiten interagiert [Cabrera et al. 1998; Witherow et al. 2000].

Die Erkenntnis, dass nur spezielle  $\beta\gamma$ -Untereinheiten in der Lage sind, die TRPM3-Hemmung zu vermitteln, ist von besonderem Interesse, da die  $\beta\gamma$ -Selektivität und die funktionelle Rolle der verschiedenen  $\beta\gamma$ -Untereinheiten bis dato nur äußerst schlecht verstanden sind [Smrcka 2008].

Um eine Beteiligung von  $\beta\gamma$ -Untereinheiten an der  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor-bedingten Inhibition der TRPM3-Aktivität zu überprüfen, wurden im Anschluss Experimente mit  $\beta\gamma$ -Scavengern (myr-Phosducin und myr- $\beta$ -ARKct), Proteinen, die  $\beta\gamma$ -Untereinheiten binden bzw. abfangen können, durchgeführt. Es zeigte sich, dass eine Überexpression dieser Scavenger die durch Noradrenalin induzierte TRPM3-Hemmung deutlich abschwächt. Ebenso konnte die durch mGlu6 vermittelte Hemmung von TRPM3 aufgehoben werden. Im Überexpressionssystem mit TRPM3 exprimierenden Zellen zeigte sich weiterhin, dass Zellen, die myr- $\beta$ -ARKct überexprimieren, eine erhöhte basale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration aufweisen. Eine Überexpression des Scavengers in HEK293 Zellen (exprimieren endogen keine TRPM3-Kanäle) führte hingegen zu keiner Erhöhung (Abb. 4-22 I). Dies deutet darauf hin, dass (zumindest im heterologen Überexpressionssystem) ein Abfangen von  $\beta\gamma$ -Untereinheiten zu einer gesteigerten konstitutiven TRPM3-Aktivität führt. Ferner konnte durch Expression von myr- $\beta$ -ARKct, die durch Überexpression von  $\beta_1\gamma_2$  hervorgerufene Reduktion der PS-Antwort abgeschwächt werden (Abb. 4-23).

Die Überexpressionsexperimente lassen zwar auf eine Beteiligung von  $\beta\gamma$ -Untereinheiten an der TRPM3-Inhibition schließen, zwischen den Transfektionen und

den eigentlichen Messungen lagen jedoch 48 h. Es wäre beispielsweise denkbar, dass die  $\beta\gamma$ -Überexpression lediglich dazu führt, dass keine TRPM3-Kanäle mehr an die Plasmamembran gebracht werden. Durch natürlichen Protein-Turn-Over würde sich somit nach und nach die Kanalkonzentration an der Plasmamembran verringern, so dass letztendlich die verminderte PS-Antwort nur ein Resultat einer reduzierten Anzahl von TRPM3-Kanälen an der Plasmamembran wäre. Auch könnten die überexprimierten  $\beta\gamma$ -Untereinheiten unbekannte Effektoren oder Signalwege aktivieren, die auf die eine oder andere Weise zu einer Verminderung der PS-Antwort führen. Genauso wäre es denkbar, dass eine Überexpression von  $\beta\gamma$ -Scavengern durch Abfangen von  $\beta\gamma$ -Untereinheiten lediglich den gesamten G-Protein gekoppelten Signalweg zerstört. Die  $G\alpha$ -Untereinheiten könnten keine  $\beta\gamma$ -Untereinheit mehr binden und wären nicht mehr in der Lage, mit dem GPCR zu interagieren. Der  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor wäre folglich von seinem G-Protein entkoppelt und könnte keine Inhibition vermitteln. Diese Überlegungen zeigen, dass Überexpressionsexperimente deutliche methodische Nachteile aufweisen könnten. Aus diesem Grund wurden im Folgenden Experimente mit dem  $\beta\gamma$ -Bindepeptid mSIRK durchgeführt (Abb. 4-24). Das Peptid bindet an  $\beta\gamma$ -Untereinheiten und führt zu einer Dissoziation des  $\beta\gamma$ -Komplexes von der  $G\alpha$ -Untereinheit. Dabei wird jedoch kein Nukleotidaustausch induziert und die  $G\alpha$ -Untereinheit sollte in einem inaktiven Zustand verbleiben. Lediglich die freigesetzten  $\beta\gamma$ -Untereinheiten können mit Zielproteinen interagieren. Bei mSIRK handelt es sich um ein membrangängiges Peptid, das deshalb nicht in den Zellen überexprimiert werden muss [Goubaeva et al. 2003]. Dementsprechend bedarf es nur einer relativ kurzen Inkubationszeit, um das Peptid in die Zellen einzubringen. In dieser Zeit sollte kein erheblicher Protein-Turn-Over vonstatten gehen und der beobachtete Effekt sollte nur auf die freigesetzten  $\beta\gamma$ -Untereinheiten zurückzuführen sein. Zellen, die mit mSIRK behandelt wurden, zeigten eine starke Reduktion der PS-Antwort, wohingegen die inaktive Form mSIRK<sub>L9a</sub> keine Reduktion der TRPM3-Aktivität hervorrief. Folglich bestätigen diese Experimente, dass  $\beta\gamma$ -Untereinheiten eine Inhibition der TRPM3-Aktivität vermitteln. Außerdem bekräftigen sie weiterhin, dass die  $G\alpha$ -Untereinheiten nicht am Inhibitionsmechanismus beteiligt sind.

Es stellt sich die Frage, auf welche Art und Weise die  $\beta\gamma$ -Untereinheiten die Inhibition vermitteln. Zum einen wäre eine direkte Interaktion mit den TRPM3-Kanälen denkbar,

zum anderen könnten noch andere Signalkomponenten zwischengeschaltet sein, die die eigentliche Hemmung induzieren. Einer der prominentesten Effektoren von  $\beta\gamma$ -Untereinheiten ist die Phospholipase  $\beta_2$  (PLC $\beta_2$ ). PLC $\beta$  werden durch  $\alpha$ -Untereinheiten der  $G\alpha_q$ -Familie,  $\beta\gamma$ -Untereinheiten und durch  $Ca^{2+}$  aktiviert. Die Aktivierung durch  $G\alpha_q$ -Untereinheiten ist dabei am stärksten, aber PLC $\beta_1$ , PLC $\beta_2$  und PLC $\beta_3$  werden auch durch  $\beta\gamma$ -Untereinheiten stimuliert. Die PLC $\beta_2$ -Isoform zeigt dabei die größte Sensitivität gegenüber  $\beta\gamma$ -Untereinheiten [Kadamur & Ross 2013]. Die PLC's sind in der Lage, PIP $_2$  zu spalten und auf diese Weise die beiden „second messenger“ IP $_3$  und DAG zu produzieren. Hieraus ergeben sich mehrere Möglichkeiten, inwiefern die Inhibition vermittelt werden könnte. Zum einen könnte die Abnahme der PIP $_2$ -Konzentration in der Plasmamembran zu einer Erniedrigung der TRPM3-Aktivität führen. Dies ist von besonderem Interesse, da eine mögliche Interaktion von TRPM3-Kanälen mit PIP $_2$  bereits beschrieben wurde [Holendova et al. 2012]. Eine PIP $_2$ -Abhängigkeit konnte auch schon für mehrere TRP-Kanäle gezeigt werden. Als Beispiel ist auch hier wieder TRPM8 zu nennen. Eine Depletion von PIP $_2$  in der Plasmamembran führt zu einer drastischen Abnahme der TRPM8-Aktivität [Zakharian et al. 2010; Yudin et al. 2011]. Andererseits könnte die Hemmung auch direkt durch den membrangebundenen „second messenger“ DAG hervorgerufen werden oder die DAG-bedingte Aktivierung der PKC führt letztendlich zur Hemmung der TRPM3-Aktivität. All diese Fälle setzen jedoch einen Abbau von PIP $_2$  voraus. In TIRF-Experimenten mit dem PIP $_2$ -Sensor PH-PLC $\delta 1$  konnte jedoch gezeigt werden, dass die Stimulierung von  $\alpha_2$ -Adrenorezeptoren in Ins1 Zellen keinen messbaren Abbau von PIP $_2$  in der Plasmamembran induziert (Abb. 4-25 A, D). Auch konnte keine messbare Entstehung von DAG mittels des DAG-Sensors (PKC $\gamma C1$ ) detektiert werden, nachdem Noradrenalin appliziert wurde (Abb. 4-25 B, C, E, F). Insofern kann eine Involvierung der PLC weitgehend ausgeschlossen werden.

Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass Noradrenalin eine geringe, mit den verwendeten Translokationssensoren nicht detektierbare Änderung der PIP $_2$ - bzw. DAG-Konzentration induziert, die wiederum einen Einfluss auf die TRPM3-Aktivität hat. Einen weiteren Hinweis, dass ein PIP $_2$ -Abbau nicht an der  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor vermittelten TRPM3-Inhibition beteiligt ist, könnten die Experimente in der Cell-Attached-Konfiguration (Abb. 4-16) liefern. Zhang et al. beschrieben, dass bei Messungen in der Cell-Attached-Konfiguration eine Depletion von PIP $_2$  außerhalb des

Membranpatches auch zu einer Verminderung der PIP<sub>2</sub>-Konzentration innerhalb des Patches führt. PIP<sub>2</sub> soll in der Lage sein, aus Bereichen hoher PIP<sub>2</sub>-Konzentration (innerhalb des Patches) in Bereiche mit niedrigerer Konzentration (außerhalb des Patches, nach PIP<sub>2</sub>-Abbau) zu diffundieren. Somit soll die PIP<sub>2</sub>-Konzentration auch innerhalb des Patches abnehmen, wenn der eigentliche Abbau nur außerhalb des Patches induziert wurde.  $\beta\gamma$ -Untereinheiten hingegen sollen nicht in der Lage sein, den Rand des Patches zu überqueren [Zhang et al. 2003]. Demzufolge hätte es auch bei den Messungen in der Cell-Attached-Konfiguration (wenn es sich bei der TRPM3-Hemmung um einen PIP<sub>2</sub>-vermittelten Signalweg handeln würde) bei Noradrenalin-Applikation außerhalb des Membranpatches zu einer Verminderung der TRPM3-Aktivität kommen müssen. Dies war jedoch nicht der Fall.

Die TIRF-Experimente ließen eine Involvierung der PLC bzw. PIP<sub>2</sub> am Inhibitionsmechanismus als eher unwahrscheinlich erscheinen. Dementsprechend sollte es auch zu keiner Aktivierung der PKC (die durch DAG aktiviert wird) kommen. Messungen mit PKC-Inhibitoren bestätigten weitgehend die Unabhängigkeit der  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor vermittelten TRPM3-Inhibition von der PKC-Aktivität (Abb. 4-26). Der PKC-Inhibitor Staurosporin induzierte jedoch eine nicht reversible Hemmung der TRPM3-Aktivität und auch Bisindolylmaleimid IV reduzierte geringfügig die PS-Antwort. Die Substanzen könnten somit einen direkten Effekt auf TRPM3 ausüben bzw. könnte die von ihnen vermittelte Hemmung der PKC zu einer Reduktion der Kanal-Aktivität führen. Wäre die PKC an der Noradrenalin-bedingten Inhibition von TRPM3 beteiligt, so würde man jedoch bei einer Inhibition der PKC keine Hemmung der TRPM3-Aktivität erwarten. Diese Daten, in Kombination mit den Ergebnissen aus den oben genannten Experimenten, lassen eine Beteiligung der PLC, den „second Messengern“ DAG und IP<sub>3</sub>, der PIP<sub>2</sub>-Konzentration und der PKC an der  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor vermittelten TRPM3-Inhibition als unwahrscheinlich erscheinen.

Ebenso konnte eine Beteiligung der PLA<sub>2</sub>, die ebenfalls durch  $\beta\gamma$ -Untereinheiten stimuliert werden kann [Jelsema & Axelrod 1987], ausgeschlossen werden. Eine Inhibition der PLA<sub>2</sub> mit ACA führte zwar zu einer geringen Abschwächung der  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor vermittelten TRPM3-Inhibition (Abb. 4-27). Die Abschwächung ist jedoch so geringfügig, dass die PLA<sub>2</sub> nicht der Hauptmediator der Inhibition sein kann. Für TRPM8 konnte hingegen eine PLA<sub>2</sub> vermittelte Inhibition gezeigt werden. Eine

Hemmung der PLA<sub>2</sub> konnte in diesem Fall die Inhibition jedoch vollständig aufheben [Bavencoffe et al. 2011].

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von TRPM3 unabhängig von löslichen cytosolischen Komponenten ist. In Giant-Inside-Out Patch-Clamp Experimenten führte die intrazelluläre Applikation von GTPγS und somit eine vermutete Aktivierung von endogenen G-Proteinen zu einer Hemmung der TRPM3-Aktivität (Abb. 4-28 A, B, C). In der Inside-Out-Konfiguration wird ein Membranbereich aus der Zelle herausgerissen. Somit sollten alle cytosolischen Komponenten, die nicht auf irgendeine Weise mit der Membran verbunden sind, ausgewaschen werden. Unter der Voraussetzung, dass GTPγS keine direkte inhibitorische Wirkung auf TRPM3 ausübt (dies kann nämlich nicht ausgeschlossen werden), kann somit eine Beteiligung von löslichen, cytosolischen Komponenten als unwahrscheinlich angesehen werden.

Da eine Involvierung der membrangebunden PLC und auch eine Beteiligung von löslichen cytosolischen Komponenten weitgehend an der TRPM3-Hemmung ausgeschlossen werden kann, erscheint eine direkte Interaktion der βγ-Untereinheiten mit den TRPM3-Kanälen als wahrscheinlich.

In der vorliegenden Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass nicht alle TRPM3-Spleißvarianten sensitiv für die durch α<sub>2</sub>-Adrenorezeptor vermittelte Inhibition sind. Dafür verantwortlich scheint eine 10 Aminosäure lange Sequenz zu sein, die durch Exon 17 kodiert wird. Ein Fehlen dieser Sequenz führt zu einer Insensitivität der Kanal-Aktivität gegenüber Noradrenalin und einer Hemmung durch βγ-Überexpression. Dieses Phänomen verdeutlicht, dass es eine Verbindung zwischen der Noradrenalin vermittelten und der durch βγ-Untereinheiten vermittelten TRPM3-Inhibition gibt. Beide Effekte scheinen von der gleichen Proteinsequenz abhängig zu sein. Dies lässt es als äußerst wahrscheinlich erscheinen, dass beide Inhibitionsmechanismen identisch sind und die durch Noradrenalin induzierte TRPM3-Inhibition durch βγ-Untereinheiten vermittelt wird.

Interessanterweise konnte die Aktivität von TRPM1ΔEx11 [Lambert et al. 2011] (der wie TRPM3α2, TRPM3α3 und TRPM3α6 die 10 Aminosäure lange Sequenz besitzt) ebenfalls durch eine Expression von β<sub>1</sub>γ<sub>2</sub> vermindert werden (Abb. 4-32). Um jedoch mit Bestimmtheit sagen zu können, dass auch im Falle von TRPM1ΔEx11 die βγ-Sensitivität über diese 10 Aminosäuren definiert wird, müsste überprüft werden, ob

eine TRPM1-Mutante, bei der dieser Bereich deletiert wurde, keine  $\beta\gamma$ -bedingte Hemmung mehr aufweist.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass bestimmte  $\beta\gamma$ -Untereinheiten TRPM3 inhibieren können.  $\beta\gamma$ -Untereinheiten werden jedoch nicht nur nach Aktivierung von  $G\alpha_{i/o}$ -gekoppelten GPCR, sondern bei der Aktivierung jeglicher GPCR freigesetzt. Somit wäre es theoretisch möglich, dass eine generelle Aktivierung von GPCR zu einer Hemmung von TRPM3 führt. Die meisten durch  $\beta\gamma$ -Untereinheiten vermittelten Effekte werden jedoch durch  $G\alpha_{i/o}$ -gekoppelte GPCR initiiert. Eine mögliche Erklärung hierfür liegt in einer generell deutlich höheren Expression von  $G\alpha_i$ -Untereinheiten im Vergleich zu beispielsweise  $G\alpha_s$  oder  $G\alpha_q$  [Kadamur & Ross 2013]. Folglich sind sie in der Lage,  $\beta\gamma$ -Untereinheiten in großen Mengen freizusetzen, um  $\beta\gamma$ -bedingte Effekte hervorzurufen. Diese Hypothese wird durch die Tatsache untermauert, dass auch die übrigen  $G\alpha$ -Untereinheiten in der Lage sind,  $\beta\gamma$ -bedingte Effekte hervorzurufen, wenn sie bzw. die entsprechenden Rezeptoren überexprimiert werden [Kadamur & Ross 2013]. In diesem Zusammenhang konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine Aktivierung von endogenen  $G\alpha_s$ -gekoppelten GPCR ( $\beta$ -Adrenorezeptoren durch Isoproterenol (Abb. 4-5 B, E)) zu keiner Hemmung der TRPM3-Aktivität führt. Es wäre also möglich, dass eine Aktivierung dieser Rezeptoren nicht zu einer ausreichend starken Freisetzung von  $\beta\gamma$ -Untereinheiten führt.

Es wäre jedoch auch denkbar, dass eine TRPM3-Inhibition nach Aktivierung eines GPCR nur dann induziert wird, wenn sich der Rezeptor und der TRPM3-Kanal in enger räumlicher Nähe befinden und eine Art Mikrodomäne bilden. Aufgrund dieser räumlichen Nähe wäre nach Aktivierung des GPCR lokal eine hohe  $\beta\gamma$ -Konzentration gegeben, die zu einer Inhibition des TRPM3-Kanals führen könnte. Insofern würde auch die Möglichkeit bestehen, dass andere  $G\alpha_s$ - oder  $G\alpha_q$ -gekoppelten GPCR, die sich vielleicht zusammen mit TRPM3 in einer Mikrodomäne befinden, durch Freisetzung von  $\beta\gamma$ -Untereinheiten den Kanal modulieren könnten. Außerdem könnte TRPM3 noch durch weitere Signalwege reguliert werden (beispielsweise  $G\alpha_q$ -vermittelter  $PIP_2$ -Abbau).

## 5.2 Mögliche Rolle und Funktion von TRPM3 in pankreatischen $\beta$ -Zellen

Wie bereits in der Einleitung beschrieben wurde, ist die physiologische Rolle von TRPM3 in  $\beta$ -Zellen noch nicht vollständig verstanden. Einerseits konnte gezeigt werden, dass eine pharmakologische Aktivierung des Kanals durch PS die Glucose-induzierte Insulinfreisetzung fördert [Wagner et al. 2008; Klose et al. 2011], andererseits bedurfte es dabei Konzentrationen, die die physiologisch vorkommenden PS-Konzentrationen wahrscheinlich deutlich übersteigen [De Peretti & Mappus 1983; Havlíková et al. 2002; Hill et al. 2002]. Auch wenn die natürlich vorkommenden PS-Konzentrationen wahrscheinlich zu niedrig sind, um eine Insulinfreisetzung zu induzieren, ist es denkbar, dass es weitere endogene Substanzen gibt, die TRPM3 in physiologischen Konzentrationen aktivieren und so die Insulinfreisetzung fördern.

TRPM3 Knock-Out Mäuse weisen jedoch keine Veränderung des Ruheglucoselevels auf [Vriens et al. 2011]. Dies spricht zunächst gegen eine essentielle Rolle der TRPM3-Kanäle bei der Insulinfreisetzung. Andererseits konnte in der vorliegenden Arbeit klar gezeigt werden, dass TRPM3 einer starken  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor vermittelten Regulation unterliegt. Somit stellt sich die Frage, warum TRPM3 in  $\beta$ -Zellen überhaupt reguliert wird?

TRPM3 könnte einer der Ionenkanäle sein, die den bisher noch nicht bekannten Hintergrundstrom bilden, der nach der Glucose-induzierten Inhibierung der  $K_{ATP}$ -Kanäle eine Depolarisation der  $\beta$ -Zellen bewirken. Es konnte gezeigt werden, dass im heterologen Überexpressionssystem bei 37 °C auch physiologische PS-Konzentrationen (100 nM) eine TRPM3-Aktivierung induzieren können [Vriens et al. 2011]. Würde dies auch im Falle der  $\beta$ -Zellen zutreffen, so wären die TRPM3-Kanäle bei Körpertemperatur aktiviert und würden einen stetigen Kationeneinstrom in die  $\beta$ -Zellen gewährleisten. Dieser könnte nach Inhibierung der  $K_{ATP}$ -Kanäle zur Depolarisation der  $\beta$ -Zellen beitragen. Weiterhin könnte das durch TRPM3 in die Zelle einströmende  $Ca^{2+}$  wiederum TRPM5-Kanäle aktivieren und somit eine Depolarisation der  $\beta$ -Zellen verstärken. TRPM5 wird durch intrazelluläres  $Ca^{2+}$  aktiviert und scheint an der Insulinfreisetzung in  $\beta$ -Zellen beteiligt zu sein [Colsoul et al. 2010; Uchida & Tominaga 2011]. Da TRPM3 Knock-Out Mäuse normale Ruheglucoselevel aufweisen, ist es allerdings unwahrscheinlich, dass TRPM3 alleine für die Depolarisation der  $\beta$ -Zellen

nach der Glucose-induzierten Schließung der  $K^+$ -Kanäle verantwortlich ist. Es ist jedoch durchaus denkbar, dass er daran beteiligt ist.

Wie bereits beschrieben, führt Noradrenalin zu einer Hyperpolarisation der Zellen durch Aktivierung von  $K^+$ -Kanälen (siehe Kapitel 1.11). Je stärker die Zellen hyperpolarisiert werden, desto stärker wäre jedoch auch ein TRPM3-vermittelter Kationeneinstrom in die  $\beta$ -Zellen, der wiederum einer Hyperpolarisation entgegenwirken würde. Da TRPM3 (wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde) jedoch ebenfalls durch  $\alpha_2$ -Adrenorezeptoren inhibiert wird, bleibt ein TRPM3-bedingter kontraproduktiver Ioneneinstrom aus. Dadurch wäre eine effektive, durch  $\alpha_2$ -Adrenorezeptoren vermittelte Hyperpolarisation der  $\beta$ -Zellen und somit eine verminderte Insulinausschüttung sichergestellt.

### 5.3 Ausblick und weiterführende Experimente

Die in dieser Arbeit präsentierten Daten weisen darauf hin, dass die  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor vermittelte TRPM3-Inhibition möglicherweise durch eine direkte Interaktion der  $\beta\gamma$ -Untereinheiten mit den TRPM3-Kanälen induziert wird. Um dies letztendlich sicher beweisen zu können, wären jedoch noch zusätzliche Experimente von Nöten. Eine direkte  $\beta\gamma$ -Applikation in Giant-Inside-Out Experimenten (die aufgrund der inhibitorischen Wirkung der Detergenzien nicht durchgeführt wurden (Abb. 4-29)) würde zwar bestätigen, dass  $\beta\gamma$ -Untereinheiten eine Hemmung der TRPM3-Aktivität induzieren, jedoch muss dies nicht zwangsläufig auf eine direkte Interaktion zurückzuführen sein. Es wäre denkbar, dass eine bisher noch unbekannte, membranständige Komponente durch  $\beta\gamma$ -Untereinheiten aktiviert würde und wiederum die eigentliche Inhibition vermittelt. Ein direkter, funktioneller Effekt von  $\beta\gamma$ -Untereinheiten auf TRPM3 müsste beispielsweise in Experimenten mit einer „black lipid layer“ (einer künstlichen Lipidschicht), in der nur der TRPM3-Kanal eingebracht würde, untersucht werden. Falls in einem solchen Modell  $\beta\gamma$ -Untereinheiten eine TRPM3-Inhibition induzieren würden, könnte man von einem direkten Effekt ausgehen, da sich keine weiteren, möglichen Effektoren in der Lipidschicht befinden. Parallel dazu wäre es wünschenswert, die Interaktion molekularbiologisch zeigen zu können. Mit Hilfe von Immunopräzipitation sollte eine direkte Bindung nachweisbar sein. Eine mögliche direkte Bindung röntgenkristallographisch zu zeigen (wie im Falle



von GIRK2 und  $\beta\gamma$ -Untereinheiten gezeigt werden konnte [Whorton & MacKinnon 2013]) wäre zwar wünschenswert, mit dem nativen, vollständigen Kanal ist dies jedoch äußerst schwierig. Bisher konnte noch kein TRP-Kanal vollständig kristallisiert werden. Außerdem wäre weiterhin eine genauere Betrachtung und Untersuchung der 10 Aminosäure langen Sequenz, die durch Exon 17 codiert wird, wünschenswert. Dabei sollte untersucht werden, ob die gesamte Sequenz (also alle 10 Aminosäuren) oder nur bestimmte Aminosäuren innerhalb dieser Sequenz essentiell notwendig sind, um den TRPM3-Kanälen eine Noradrenalin-/ $\beta\gamma$ -Sensitivität zu verleihen.

Bis heute wurde lediglich die Expression der TRPM3 $\alpha$ 2- und TRPM3 $\alpha$ 7-Spleißvariante in  $\beta$ -Zellen näher untersucht. Die Expression der übrigen (speziell der Noradrenalin-/ $\beta\gamma$ -insensitiven Spleißvarianten TRPM3 $\alpha$ 4 und TRPM3 $\alpha$ 5) Spleißformen sollte in Zukunft mittels quantitativer RT-PCR in  $\beta$ -Zellen ebenfalls untersucht werden. Falls diese Noradrenalin-/ $\beta\gamma$ -insensitiven Spleißvarianten exprimiert würden, stünde der Zelle ein Mechanismus zur Verfügung, durch Expression der unterschiedlichen Spleißvarianten den Grad der TRPM3-Inhibition zu regulieren. Durch eine verstärkte Expression der insensitiven Varianten könnte somit die Hemmung der Kanäle vermindert werden oder umgekehrt durch Expression der sensitiven Spleißformen der Noradrenalin Effekt verstärkt werden. Besonders interessant wäre es, ob gewisse Faktoren, z.B. eine dauerhaft erhöhte Noradrenalin-Konzentration, eine Änderung der Spleißform-Expression induziert. Dies würde der Zelle einen durch alternatives Spleißen vermittelten Regulationsmechanismus ermöglichen. Dass die Expression von Spleißvarianten durch gewisse Faktoren beeinflusst werden kann, konnte bereits gezeigt werden. In Ins1 Zellen führt eine Erniedrigung der Glucosekonzentration (von 13 mM zu 2 mM) zu einer signifikanten Abnahme der Expression der inaktiven TRPM3 $\alpha$ 7-Spleißvariante [Frühwald et al. 2012].

Der Focus der Arbeit lag auf der Untersuchung der  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor vermittelten Hemmung von TRPM3 in  $\beta$ -Zellen. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass andere  $G\alpha_{i/o}$ -gekoppelten GPCR in der Lage sind, eine TRPM3-Inhibition zu induzieren (Abb. 4-10 und 4-11). Dies führt zu der Überlegung, dass noch weitere, wenn nicht sogar alle  $G\alpha_{i/o}$ -gekoppelte GPCR prinzipiell eine Hemmung von TRPM3-Kanälen induzieren können. Insofern wäre es äußerst interessant, die Regulation von TRPM3 durch endogene  $G\alpha_{i/o}$ -gekoppelte GPCR in anderen Zelltypen zu untersuchen. Von

besonderem Interesse wären hierbei nozizeptive Neurone der Hinterwurzelganglien. In diesen Zellen konnte gezeigt werden, dass TRPM3 als Temperatur-Sensor für schädliche Hitze dient [Vriens et al. 2011]. In Anbetracht dessen, dass TRPM3 in diesen Zellen an der Schmerzwahrnehmung beteiligt ist, stellt sich die Frage, ob beispielsweise  $G\alpha_{i/o}$ -gekoppelte Opioidrezeptoren, die eine schmerzlindernde Wirkung vermitteln, ebenfalls eine Hemmung der TRPM3-Aktivität induzieren können. Für TRPV1-Kanäle, die auch an der Wahrnehmung von schädlicher Hitze beteiligt sind, konnte bereits gezeigt werden, dass  $G\alpha_{i/o}$ -gekoppelte Opioidrezeptoren die TRPV1-Aktivität in DRG Neuronen inhibieren können [Endres-Becker et al. 2007]. In diesen Zusammenhang wäre natürlich auch interessant zu erforschen, welche TRPM3-Spleißformen in diesen Zellen exprimiert werden. Würde es beispielsweise bei einer Entzündung zu einer verstärkten Expression von Inhibitions-insensitiven TRPM3-Kanälen kommen, so könnte dies möglicherweise zu der typischen entzündungsbedingten Hitze-Überempfindlichkeit beitragen.

In Kapitel 5.2 wurde eine mögliche Rolle und Funktion von TRPM3 in pankreatischen  $\beta$ -Zellen diskutiert. Bei all diesen Überlegungen handelt es sich natürlich weitgehend um Spekulationen und es bedürfte intensiver weiterer Forschung, um diese bestätigen zu können. Aber auch wenn TRPM3 keine wichtige physiologische Rolle in  $\beta$ -Zellen spielen sollte, so ist er dennoch einer der wenigen in  $\beta$ -Zellen vorkommende TRP-Kanäle, der pharmakologisch aktiviert werden kann und dessen Aktivierung eine Insulinfreisetzung fördert. Für TRPM5 beispielsweise wurde eine pharmakologische Aktivierung bisher nicht beschrieben. Insofern ist TRPM3 ein attraktives pharmakologisches Drug-Target in  $\beta$ -Zellen. Eine Förderung der Insulinfreisetzung durch TRPM3-Aktivierung ist aus zweierlei Gründen besonders interessant. Zum einen scheint eine Aktivierung von TRPM3 die Insulinfreisetzung nur dann zu verstärken, wenn eine erhöhte Glucosekonzentration vorliegt [Wagner et al. 2008]. Eine Insulinfreisetzung würde also nur dann gefördert, wenn auch ein erhöhter Insulinbedarf vorliegen würde. Andererseits zeigt die vorliegende Arbeit, dass die TRPM3-Aktivität einer starken Regulation durch Noradrenalin unterliegt. Eine TRPM3-bedingte Verstärkung der Insulinfreisetzung ist somit teilweise den physiologischen Rahmenbedingungen angepasst. Unter Stressbedingungen wie schwerer körperlicher Aktivität, bei denen eine Insulinfreisetzung und somit ein niedriger Blutglucoselevel unerwünscht sind,

würde eine TRPM3-bedingte Steigerung der Insulinausschüttung verhindert werden. Somit wäre das Risiko einer Hypoglykämie bei starker körperlicher Anstrengung deutlich vermindert. Aus diesen Gründen wären weitere Studien, die sich mit TRPM3 als mögliches Drug-Target im Kontext von Diabetes beschäftigen, wünschenswert.

## 6. Literaturverzeichnis

Ahrén B (2000). Autonomic regulation of islet hormone secretion--implications for health and disease. *Diabetologia* Apr; 43 (4): 393 - 410.

Ahrén B (2009). Islet G protein-coupled receptors as potential targets for treatment of type 2 diabetes. *Nat Rev Drug Discov.* May; 8 (5): 369 - 385.

Aittoniemi J, Fotinou C, Craig TJ, de Wet H, Proks P, Ashcroft FM (2009). Review. SUR1: a unique ATP-binding cassette protein that functions as an ion channel regulator. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* Jan 27; 364 (1514): 257 - 267.

Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K (2005). *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.* Elsevier Urban & Fischer 9. Auflage

Ambrose E J (1956). A surface contact microscope for the study of cell movements. *Nature* Nov 24; Vol. 178.

Ammälä C, Ashcroft FM, Rorsman P (1993). Calcium-independent potentiation of insulin release by cyclic AMP in single beta-cells. *Nature* May 27; 363 (6427): 356 - 358.

Angel I, Niddam R, Langer SZ (1990). Involvement of alpha-2 adrenergic receptor subtypes in hyperglycemia. *J Pharmacol Exp Ther.* Sep; 254 (3): 877 - 882.

Asfari M, Janjic D, Meda P, Li G, Halban PA, Wollheim CB (1992). Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology*, 130, 167-78.

Ashcroft FM, Harrison DE, Ashcroft SJ (1984). Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells. *Nature* Nov 29 - Dec 5; 312 (5993): 446 - 448.

Ashcroft FM, Rorsman P (1989). Electrophysiology of the pancreatic beta-cell. *Prog Biophys Mol Biol.* 54 (2): 87 - 143.

Atwood BK, Lopez J, Wager-Miller J, Mackie K, Straiker A (2011). Expression of G protein-coupled receptors and related proteins in HEK293, AtT20, BV2, and N18 cell lines as revealed by microarray analysis. *BMC Genomics.* Jan 7; 12: 14.

Audubert F, Klapisz E, Berguerand M, Gouache P, Jouniaux AM, Béréziat G, Masliah J (1999). Differential potentiation of arachidonic acid release by rat alpha2 adrenergic receptor subtypes. *Biochim Biophys Acta.* Mar 25; 1437 (3): 265 - 276.

Axelrod D (1989). Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence. *JCB* Apr; 89: 141-145.

Balla T, Várnai P (2009). Visualization of cellular phosphoinositide pools with GFP-fused protein-domains. *Curr Protoc Cell Biol.* Mar; Chapter 24: Unit 24.4.

Bavencoffe A, Gkika D, Kondratskyi A, Beck B, Borowiec AS, Bidaux G, Busserolles J, Eschalier A, Shuba Y, Skryma R, Prevarskaya N (2010). The transient receptor potential channel TRPM8 is inhibited via the alpha 2A adrenoceptor signaling pathway. *J Biol Chem.* Mar 26; 285 (13): 9410 - 9419.

Bavencoffe A, Kondratskyi A, Gkika D, Mauroy B, Shuba Y, Prevarskaya N, Skryma R (2011). Complex regulation of the TRPM8 cold receptor channel: role of arachidonic acid release following M3 muscarinic receptor stimulation. *J Biol Chem.* Mar 18; 286 (11): 9849 - 9855.

Beavo JA, Rogers NL, Crofford OB, Hardman JG, Sutherland EW, Newman EV (1970). Effects of xanthine derivatives on lipolysis and on adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase activity. *Mol Pharmacol.* Nov; 6 (6): 597 - 603.

Beqollari D, Betzenhauser MJ, Kammermeier PJ (2009). Altered G-protein coupling in an mGluR6 point mutant associated with congenital stationary night blindness. *Mol Pharmacol.* Nov; 76 (5): 992 - 997.

Blackmer T, Larsen EC, Bartleson C, Kowalchuk JA, Yoon EJ, Preininger AM, Alford S, Hamm HE, Martin TF (2005). G protein betagamma directly regulates SNARE protein fusion machinery for secretory granule exocytosis. *Nat Neurosci.* Apr; 8 (4): 421 - 425.

Blad CC, Tang C, Offermanns S (2012). G protein-coupled receptors for energy metabolites as new therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov.* Aug; 11 (8): 603-619.

Bokvist K, Ammälä C, Berggren PO, Rorsman P, Wåhlander K (1991). Alpha 2-adrenoceptor stimulation does not inhibit L-type calcium channels in mouse pancreatic beta-cells. *Biosci Rep.* Jun; 11 (3): 147 - 157.

Brixel LR, Monteilh-Zoller MK, Ingenbrandt CS, Fleig A, Penner R, Enklaar T, Zabel BU, Prawitt D (2010). TRPM5 regulates glucose-stimulated insulin secretion. *Pflugers Arch.* Jun; 460(1): 69-76.

Burch RM, Axelrod J (1987). Dissociation of bradykinin-induced prostaglandin formation from phosphatidylinositol turnover in Swiss 3T3 fibroblasts: evidence for G protein regulation of phospholipase A2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep; 84 (18): 6374 - 6378.

Cabrera JL, de Freitas F, Satpaev DK, Slepak VZ (1998). Identification of the Gbeta5-RGS7 protein complex in the retina. *Biochem Biophys Res Commun.* Aug 28; 249 (3): 898 - 902.

Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren PO, Caicedo A (2006). The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb 14; 103 (7): 2334 - 2339.

Cabrera-Vera TM, Vanhauwe J, Thomas TO, Medkova M, Preininger A, Mazzoni MR, Hamm HE (2003). Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr Rev*. Dec; 24 (6): 765 - 781.

Camps M, Carozzi A, Schnabel P, Scheer A, Parker PJ, Gierschik P (1992). Isozyme-selective stimulation of phospholipase C-beta 2 by G protein beta gamma-subunits. *Nature* Dec 17; 360 (6405): 684 - 686.

Cao Y, Masuho I, Okawa H, Xie K, Asami J, Kammermeier PJ, Maddox DM, Furukawa T, Inoue T, Sampath AP, Martemyanov KA (2009). Retina-specific GTPase accelerator RGS11/G beta 5S/R9AP is a constitutive heterotrimer selectively targeted to mGluR6 in ON-bipolar neurons. *J Neurosci*. Jul 22; 29 (29): 9301 - 9313.

Cao Y, Pahlberg J, Sarria I, Kamasawa N, Sampath AP, Martemyanov KA (2012). Regulators of G protein signaling RGS7 and RGS11 determine the onset of the light response in ON bipolar neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. May 15; 109 (20): 7905 – 7910.

Carbonetti NH (2010). Pertussis toxin and adenylate cyclase toxin: key virulence factors of *Bordetella pertussis* and cell biology tools. *Future Microbiol*. Mar; 5(3): 455 - 469.

Chen CA, Manning DR (2001). Regulation of G proteins by covalent modification. *Oncogene* Mar 26; 20 (13): 1643 - 1652.

Chuang HH, Yu M, Jan YN, Jan LY (1998). Evidence that the nucleotide exchange and hydrolysis cycle of G proteins causes acute desensitization of G-protein gated inward rectifier K<sup>+</sup> channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 29; 95 (20): 11727 - 11732.

Clapham DE (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature* Dec 4; 426 (6966): 517 - 524.

Clapham DE (2007). Snapshot: Mammalian TRP Channels. *Cell* Apr 6.

Clapham DE, Julius D, Montell C, Schultz G (2005). International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels. *Pharmacol Rev*. Dec; 57(4): 427 - 450.

Colsooul B, Nilius B, Vennekens R (2013). Transient receptor potential (TRP) cation channels in diabetes. *Curr Top Med Chem*. 13 (3): 258 - 269.

Colsooul B, Schraenen A, Lemaire K, Quintens R, Van Lommel L, Segal A, Owsianik G, Talavera K, Voets T, Margolskee RF, Kokrashvili Z, Gilon P, Nilius B, Schuit FC, Vennekens R (2010). Loss of

high-frequency glucose-induced  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations in pancreatic islets correlates with impaired glucose tolerance in *Trpm5*<sup>-/-</sup> mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* Mar 16; 107 (11): 5208 - 5213.

Cosens DJ, Manning A (1969). Abnormal Electroretinogram from a *Drosophila* Mutant. *Nature* Oct 18; 224: 285 – 287.

Couey JJ, Ryan DP, Glover JT, Dreixler JC, Young JB, Houamed KM (2002). Giant excised patch recordings of recombinant ion channel currents expressed in mammalian cells. *Neurosci Lett*. Aug 23; 329 (1):17-20.

Currie KP (2010). G protein modulation of  $\text{CaV}2$  voltage-gated calcium channels. *Channels* (Austin Nov-Dec; 4 (6): 497 - 509.

De Peretti E, Mappus E (1983). Pattern of plasma pregnenolone sulfate levels in humans from birth to adulthood. *J Clin Endocrinol Metab*. Sep; 57 (3): 550 - 556.

Dhingra A, Ramakrishnan H, Neinstein A, Fina ME, Xu Y, Li J, Chung DC, Lyubarsky A, Vardi N (2012).  $\text{G}\beta 3$  is required for normal light ON responses and synaptic maintenance. *J Neurosci*. Aug 15; 32 (33): 11343 - 11355.

Duncan LM, Deeds J, Hunter J, Shao J, Holmgren LM, Woolf EA, Tepper RI, Shyjan AW (1998). Down-regulation of the novel gene *melastatin* correlates with potential for melanoma metastasis. *Cancer Res*. Apr 1; 58(7): 1515-1520.

Dyachok O, Isakov Y, S  getorp J, Tengholm A (2006). Oscillations of cyclic AMP in hormone-stimulated insulin-secreting beta-cells. *Nature* Jan 19; 439 (7074): 349 - 352.

Ellis C, Nature Reviews Drug Discovery GPCR Questionnaire Participants (2004). The state of GPCR research in 2004. *Nat Rev Drug Discov*. Jul; 3 (7): 575, 577-626.

Endres-Becker J, Heppenstall PA, Mousa SA, Labuz D, Oksche A, Sch  fer M, Stein C, Z  llner C (2007).  $\mu$ -opioid receptor activation modulates transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) currents in sensory neurons in a model of inflammatory pain. *Mol Pharmacol*. Jan; 71 (1): 12 - 18.

Erler I, Hirnet D, Wissenbach U, Flockerzi V, Niemeyer BA (2004).  $\text{Ca}^{2+}$ -selective transient receptor potential V channel architecture and function require a specific ankyrin repeat. *J Biol Chem*. Aug 13; 279 (33): 34456 - 34463.

Fagerholm V, Gr  nroos T, Marjam  ki P, Viljanen T, Scheinin M, Haaparanta M (2004). Altered glucose homeostasis in  $\alpha 2\text{A}$ -adrenoceptor knockout mice. *Eur J Pharmacol*. Nov 28; 505 (1-3): 243 - 252.

Fagerholm V, Haaparanta M, Scheinin M (2011).  $\alpha 2$ -adrenoceptor regulation of blood glucose homeostasis. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. Jun; 108 (6): 365 – 370.

Federman AD, Conklin BR, Schrader KA, Reed RR, Bourne HR (1992). Hormonal stimulation of adenylyl cyclase through Gi-protein beta gamma subunits. *Nature* Mar 12; 356 (6365): 159 - 161.

Fonfria E, Murdock PR, Cusdin FS, Benham CD, Kelsell RE, McNulty S (2006). Tissue distribution profiles of the human TRPM cation channel family. *J Recept Signal Transduct Res.* 26(3): 159 - 178.

Frühwald J, Camacho Londoño J, Dembla S, Mannebach S, Lis A, Drews A, Wissenbach U, Oberwinkler J, Philipp SE (2012). Alternative splicing of a protein domain indispensable for function of transient receptor potential melastatin 3 (TRPM3) ion channels. *J Biol Chem.* Oct 26; 287(44): 36663 - 36672.

Gilman AG (1987). G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem.* 56: 615 - 649.

Gilon P, Henquin JC (2001). Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic beta-cell function. *Endocr Rev.* Oct; 22 (5): 565 - 604.

Goldin AL (2006). Expression and analysis of recombinant ion channels. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co

Goubaeva F, Ghosh M, Malik S, Yang J, Hinkle PM, Griendling KK, Neubig RR, Smrcka AV (2003). Stimulation of cellular signaling and G protein subunit dissociation by G protein betagamma subunit-binding peptides. *J Biol Chem.* May 30; 278 (22): 19634 - 19641.

Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, 36, 59-74.

Grimm C, Kraft R, Sauerbruch S, Schultz G, Harteneck C (2003). Molecular and functional characterization of the melastatin-related cation channel TRPM3. *J Biol Chem.* Jun 13; 278(24): 21493 - 21501.

Grimm C, Kraft R, Schultz G, Harteneck C (2005). Activation of the melastatin-related cation channel TRPM3 by D-erythro-sphingosine *Mol Pharmacol.* Mar; 67 (3): 798 – 805.

Grouzmann E, Cavadas C, Grand D, Moratel M, Aubert JF, Brunner HR, Mazzolai L (2003). Blood sampling methodology is crucial for precise measurement of plasma catecholamines concentrations in mice. *Pflugers Arch.* Nov; 447 (2): 254 – 258.

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985). A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* Mar 25; 260 (6): 3440-3450.



Halaszovich CR, Schreiber DN, Oliver D (2009). Ci-VSP is a depolarization-activated phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 5'-phosphatase. *J Biol Chem.* Jan 23; 284 (4): 2106 - 2113.

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* 391: 85 – 100.

Hanoune J, Defer N (2001). Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 41: 145 - 174.

Harteneck C, Frenzel H, Kraft R (2007). N-(p-amylicinnamoyl)anthranilic acid (ACA): a phospholipase A(2) inhibitor and TRP channel blocker. *Cardiovasc Drug Rev.* Spring; 25 (1): 61 - 75.

Havlíková H, Hill M, Hampl R, Stárka L (2002). Sex- and age-related changes in epitestosterone in relation to pregnenolone sulfate and testosterone in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* May; 87 (5): 2225 - 2231.

Henquin JC (2000). Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes Nov;* 49 (11): 1751 - 1760.

Hilgemann DW (1989). Giant excised cardiac sarcolemmal membrane patches: sodium and sodium-calcium exchange currents. *Pflügers Arch.* 415: 247-249.

Hill M, Parízek A, Klak J, Hampl R, Sulcová J, Havlíková H, Lapčík O, Bicíková M, Fait T, Kancheva R, Cibula D, Pouzar V, Meloun M, Stárka L (2002). Neuroactive steroids, their precursors and polar conjugates during parturition and postpartum in maternal and umbilical blood: 3.3beta-hydroxy-5-ene steroids. *J Steroid Biochem Mol Biol.* Oct; 82 (2-3): 241 - 250.

Hille B (2001). *Ion Channels of Excitable Membranes*. Third Edition Sinauer Associates, Inc.

Hoenderop JG , Voets T , Hoefs S , Weidema F , Prenen J , Nilius B , Bindels RJ (2003). Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca<sup>2+</sup> channels TRPV5 and TRPV6. *EMBO J.* Februar 17; 22 (4): 776 - 785.

Holendova B, Grycova L, Jirku M, Teisinger J (2012). PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> interacts with CaM binding domains on TRPM3 N-terminus. *Channels (Austin)* Nov-Dec; 6 (6): 479 - 482.

Holz GG 4th, Kühtreiber WM, Habener JF (1993). Pancreatic beta-cells are rendered glucose-competent by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1(7-37). *Nature* Jan 28; 361 (6410): 362 - 365.

Huang L, Max M, Margolskee RF, Su H, Masland RH, Euler T (2003). G protein subunit G gamma 13 is coexpressed with G alpha o, G beta 3, and G beta 4 in retinal ON bipolar cells. *J Comp Neurol*. Jan 1;455 (1): 1 - 10.

Hughes S, Potheary CA, Jagannath A, Foster RG, Hankins MW, Peirson SN (2012). Profound defects in pupillary responses to light in TRPM-channel null mice: a role for TRPM channels in non-image-forming photoreception. *Eur J Neurosci*. Jan; 35 (1): 34 - 43.

Iwanir S, Reuveny E (2008). Adrenaline-induced hyperpolarization of mouse pancreatic islet cells is mediated by G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels. *Pflugers Arch*. Sep; 456 (6): 1097 - 1108.

Jelsema CL, Axelrod J (1987). Stimulation of phospholipase A2 activity in bovine rod outer segments by the beta gamma subunits of transducin and its inhibition by the alpha subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun; 84 (11): 3623 - 3627.

Jeon JP, Hong C, Park EJ, Jeon JH, Cho NH, Kim IG, Choe H, Muallem S, Kim HJ, So I (2012). Selective G $\alpha$ i subunits as novel direct activators of transient receptor potential canonical (TRPC)4 and TRPC5 channels. *J Biol Chem*. May 18; 287 (21): 17029 – 17039.

Jiang G, Zhang BB (2003). Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. Apr; 284 (4): E671 - 678.

Kadamur G, Ross EM (2013). Mammalian phospholipase C. *Annu Rev Physiol*. 75: 127 – 154.

Kanno T, Suga S, Wu J, Kimura M, Wakui M (1998). Intracellular cAMP potentiates voltage-dependent activation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels in rat islet beta-cells. *Pflugers Arch*. Mar; 435 (4): 578 - 580.

Kedei N, Szabo T, Lile JD, Treanor JJ, Olah Z, Iadarola MJ, Blumberg PM (2001). Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. *J Biol Chem*. Jul 27; 276(30): 28613 - 28619.

Kinnamon SC (2012). Taste receptor signalling - from tongues to lungs. *Acta Physiol (Oxf)*. Feb; 204(2): 158 - 168.

Klinke R, Silbernagl S (2001). *Lehrbuch der Physiologie Thieme* 3. Auflage

Klose C, Straub I, Riehle M, Ranta F, Krautwurst D, Ullrich S, Meyerhof W, Harteneck C (2011). Fenamates as TRP channel blockers: mefenamic acid selectively blocks TRPM3. *Br J Pharmacol*. Apr; 162 (8): 1757 - 1769.

Koch WJ, Hawes BE, Inglese J, Luttrell LM, Lefkowitz RJ (1994). Cellular expression of the carboxyl terminus of a G protein-coupled receptor kinase attenuates G beta gamma-mediated signaling. *J Biol Chem*. Feb 25; 269 (8): 6193 - 6197.

Koch WJ, Inglese J, Stone WC, Lefkowitz RJ (1993). The binding site for the beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins on the beta-adrenergic receptor kinase. *J Biol Chem.* Apr 15; 268 (11): 8256 - 8260.

Koike C, Numata T, Ueda H, Mori Y, Furukawa T (2010). TRPM1: a vertebrate TRP channel responsible for retinal ON bipolar function. *Cell Calciu Aug-Sep; 48 (2-3): 95 - 101.*

Kraegen EW, James DE, Jenkins AB, Chisholm DJ (1985). Dose-response curves for in vivo insulin sensitivity in individual tissues in rats. *Am J Physiol.* Mar; 248 (3 Pt 1): E353 - 362.

Kramer RM, Sharp JD (1997). Structure, function and regulation of Ca<sup>2+</sup>-sensitive cytosolic phospholipase A2 (cPLA2). *FEBS Lett.* Jun 23; 410 (1): 49 - 53.

Kuo CH, Taniura H, Watanabe Y, Fukada Y, Yoshizawa T, Miki N (1989). Identification of a retina-specific MEKA protein as a 33 K protein. *Biochem Biophys Res Commun.* Aug 15; 162 (3): 1063 - 1068.

Kutlu B, Burdick D, Baxter D, Rasschaert J, Flamez D, Eizirik DL, Welsh N, Goodman N, Hood L (2009). Detailed transcriptome atlas of the pancreatic beta cell. *BMC Med Genomics.* Jan 15; 2: 3.

Lambert S, Drews A, Rizun O, Wagner TF, Lis A, Mannebach S, Plant S, Portz M, Meissner M, Philipp SE, Oberwinkler J (2011). Transient receptor potential melastatin 1 (TRPM1) is an ion-conducting plasma membrane channel inhibited by zinc ions. *J Biol Chem.* Apr 8; 286(14): 12221 - 12233.

Lambright DG, Noel JP, Hamm HE, Sigler PB (1994). Structural determinants for activation of the alpha-subunit of a heterotrimeric G protein. *Nature* Jun 23; 369 (6482): 621 - 628.

Law SF, Yasuda K, Bell GI, Reisine T (1993). Gi alpha 3 and G(o) alpha selectively associate with the cloned somatostatin receptor subtype SSTR2. *J Biol Chem.* May 25; 268(15): 10721 - 10727.

Lechner SG, Frenzel H, Wang R, Lewin GR (2009). Developmental waves of mechanosensitivity acquisition in sensory neuron subtypes during embryonic development. *EMBO J.* May 20; 28 (10): 1479 -1491.

Lee N, Chen J, Sun L, Wu S, Gray KR, Rich A, Huang M, Lin JH, Feder JN, Janovitz EB, Levesque PC, Blonar MA (2003). Expression and characterization of human transient receptor potential melastatin 3 (hTRPM3). *J Biol Chem.* Jun 6; 278(23): 20890-20897.

Lee RH, Lieberman BS, Lolley RN (1987). A novel complex from bovine visual cells of a 33,000-dalton phosphoprotein with beta- and gamma-transducin: purification and subunit structure. *Biochemistry.* Jun 30; 26 (13): 3983 - 3990.

Leto D, Saltiel AR (2012). Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol.* May 23; 13 (6): 383 - 396.

Lodowski DT, Barnhill JF, Pitcher JA, Capel WD, Lefkowitz RJ, Tesmer JJ (2003). Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of a complex between G protein-coupled receptor kinase 2 and G $\beta$ 1 $\gamma$ 2. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* May; 59 (Pt 5): 936 - 839.

Lodowski DT, Pitcher JA, Capel WD, Lefkowitz RJ, Tesmer JJ (2003). Keeping G proteins at bay: a complex between G protein-coupled receptor kinase 2 and G $\beta$ 2 $\gamma$ . *Science* May 23; 300 (5623): 1256 - 1262.

Logothetis DE, Kurachi Y, Galper J, Neer EJ, Clapham DE (1987). The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K<sup>+</sup> channel in heart. *Nature.* Jan 22-28; 325 (6102): 321 - 326.

Loo L, Shepherd AJ, Mickle AD, Lorca RA, Shutov LP, Usachev YM, Mohapatra DP (2012). The C-type natriuretic peptide induces thermal hyperalgesia through a noncanonical G $\beta\gamma$ -dependent modulation of TRPV1 channel. *J Neurosci.* Aug 29; 32 (35): 11942 - 11955.

MacDonald PE, Rorsman P (2006). Oscillations, intercellular coupling, and insulin secretion in pancreatic beta cells. *PLoS Biol.* Feb; 4 (2): e49.

Macrez-Leprêtre N, Kalkbrenner F, Schultz G, Mironneau J (1997). Distinct functions of Gq and G11 proteins in coupling  $\alpha$ 1-adrenoreceptors to Ca<sup>2+</sup> release and Ca<sup>2+</sup> entry in rat portal vein myocytes. *J Biol Chem.* Feb 21; 272 (8): 5261 - 5268.

Magalhaes AC, Dunn H, Ferguson SS (2012). Regulation of GPCR activity, trafficking and localization by GPCR-interacting proteins. *Br J Pharmacol.* Mar; 165 (6): 1717 - 1736.

Majeed Y, Bahnasi Y, Seymour VA, Wilson LA, Milligan CJ, Agarwal AK, Sukumar P, Naylor J, Beech DJ (2011). Rapid and contrasting effects of rosiglitazone on transient receptor potential TRPM3 and TRPC5 channels. *Mol Pharmacol.* Jun; 79 (6): 1023 - 1030.

Mayer SI, Müller I, Mannebach S, Endo T, Thiel G (2011). Signal transduction of pregnenolone sulfate in insulinoma cells: activation of Egr-1 expression involving TRPM3, voltage-gated calcium channels, ERK, and ternary complex factors. *J Biol Chem.* Mar 25; 286 (12): 10084 - 10096.

Mergler S, Singh V, Grötzinger C, Kaczmarek P, Wiedenmann B, Strowski MZ (2008). Characterization of voltage operated R-type Ca<sup>2+</sup> channels in modulating somatostatin receptor subtype 2- and 3-dependent inhibition of insulin secretion from INS-1 cells. *Cell Signal.* Dec; 20(12): 2286 – 2295.

Milligan G, Kostenis E (2006). Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br J Pharmacol.* Jan; 147 Suppl 1: S46 - 55.

Mizumura K, Sugiura T, Katanosaka K, Banik RK, Kozaki Y (2009). Excitation and sensitization of nociceptors by bradykinin: what do we know? *Exp Brain Res.* Jun; 196 (1): 53 – 65.

Montell C, Rubin GM (1989). Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* Apr; 2 (4): 1313-1323.

Montell C (2012). *Drosophila* visual transduction. *Trends Neurosci.* Jun; 35 (6): 356 - 363.

Murray AJ (2008). Pharmacological PKA inhibition: all may not be what it seems. *Sci Signal.* Jun 3; 1(22): re4.

Naylor J, Li J, Milligan CJ, Zeng F, Sukumar P, Hou B, Sedo A, Yuldasheva N, Majeed Y, Beri D, Jiang S, Seymour VA, McKeown L, Kumar B, Harteneck C, O'Regan D, Wheatcroft SB, Kearney MT, Jones C, Porter KE, Beech DJ (2010). Pregnenolone sulphate- and cholesterol-regulated TRPM3 channels coupled to vascular smooth muscle secretion and contraction. *Circ Res.* May 14; 106 (9): 1507 - 1515.

Nealen ML, Gold MS, Thut PD, Caterina MJ (2003). TRPM8 mRNA is expressed in a subset of cold-responsive trigeminal neurons from rat. *J Neurophysiol.* Jul; 90 (1): 515 - 520.

Neer EJ (1995). Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* Jan 27; 80 (2): 249-257.

Neher E, Sakmann B (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, Apr 29; 260 (5554): 799-802.

Nilius B, Owsianik G (2011). The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol.* 12(3): 218. doi: 10.1186/gb-2011-12-3-218. Epub 2011 Mar 17.

Nilius B, Prenen J, Droogmans G, Voets T, Vennekens R, Freichel M, Wissenbach U, Flockerzi V (2003). Voltage dependence of the Ca<sup>2+</sup>-activated cation channel TRPM4. *J Biol Chem.* Aug 15; 278 (33): 30813 - 30820.

Numberger M, Draguhn A (1996). *Patch-Clamp-Technik.* Spektrum, Akad. Verl.

Oancea E, Teruel MN, Quest AF, Meyer T (1998). Green fluorescent protein (GFP)-tagged cysteine-rich domains from protein kinase C as fluorescent indicators for diacylglycerol signaling in living cells. *J Cell Biol* Feb 9; 140 (3): 485 - 498.

Oberwinkler J, Lis A, Giehl KM, Flockerzi V, Philipp SE (2005). Alternative splicing switches the divalent cation selectivity of TRPM3 channels. *J Biol Chem.* Jun 10; 280(23) :22540-22548.

Owsianik G, Talavera K, Voets T, Nilius B (2006). Permeation and selectivity of TRP channels. *Annu Rev Physiol.* 68: 685 - 717.

Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* Aug 4; 289 (5480): 739 - 745.

Paravicini TM, Chubanov V, Gudermann T (2012). TRPM7: a unique channel involved in magnesium homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol.* Aug; 44(8): 1381 – 1384.

Pedersen SF, Owsianik G, Nilius B (2005). TRP channels: an overview. *Cell Calcium.* Sep-Oct; 38 (3-4): 233-252.

Peterhoff M, Sieg A, Brede M, Chao CM, Hein L, Ullrich S (2003). Inhibition of insulin secretion via distinct signaling pathways in alpha2-adrenoceptor knockout mice. *Eur J Endocrinol.* Oct; 149 (4): 343 - 350.

Piper RC, Luzio JP (2004). CUPpling calcium to lysosomal biogenesis. *Trends Cell Biol.* Sep; 14(9): 471 - 473.

Porte D Jr, Williams RH (1966). Inhibition of insulin release by norepinephrine in man. *Science* May 27; 152 (3726): 1248 - 1250.

Portela-Gomes GM, Stridsberg M, Grimelius L, Oberg K, Janson ET (2000). Expression of the five different somatostatin receptor subtypes in endocrine cells of the pancreas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* Jun; 8(2): 126 - 132.

Pusch M, Neher E (1988). Rates of diffusional exchange between small cells and a measuring patch pipette. *Pflugers Arch.* Feb; 411 (2): 204 - 211.

Quirk K, Roberts DJ, Strange PG (2007). Mechanisms of G protein activation via the D2 dopamine receptor: evidence for persistent receptor/G protein interaction after agonist stimulation. *Br J Pharmacol.* May; 151 (1): 144 - 152.

Rasmussen SG, Choi HJ, Rosenbaum DM, Kobilka TS, Thian FS, Edwards PC, Burghammer M, Ratnala VR, Sanishvili R, Fischetti RF, Schertler GF, Weis WI, Kobilka BK (2007). Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature.* Nov 15 ;450 (7168): 383 - 387.

Rasmussen SG, DeVree BT, Zou Y, Kruse AC, Chung KY, Kobilka TS, Thian FS, Chae PS, Pardon E, Calinski D, Mathiesen JM, Shah ST, Lyons JA, Caffrey M, Gellman SH, Steyaert J, Skiniotis G, Weis WI, Sunahara RK, Kobilka BK (2011). Crystal structure of the  $\beta$ 2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* Jul 19; 477 (7366): 549 - 555.

Regard JB, Kataoka H, Cano DA, Camerer E, Yin L, Zheng YW, Scanlan TS, Hebrok M, Coughlin SR (2007). Probing cell type-specific functions of Gi in vivo identifies GPCR regulators of insulin secretion. *J Clin Invest.* Dec; 117 (12): 4034 - 4043.

Rishal I, Porozov Y, Yakubovich D, Varon D, Dascal N (2005). Gbetagamma-dependent and Gbetagamma-independent basal activity of G protein-activated K<sup>+</sup> channels. *J Biol Chem.* Apr 29; 280 (17): 16685 - 16694.

Rodriguez-Diaz R, Abdulreda MH, Formoso AL, Gans I, Ricordi C, Berggren PO, Caicedo A (2011). Innervation patterns of autonomic axons in the human endocrine pancreas. *Cell Metab.* Jul 6; 14 (1): 45 - 54.

Rohacs T (2013). Regulation of transient receptor potential channels by the phospholipase C pathway. *Adv Biol Regul.* Jul 17. pii: S2212-4926(13)00053-5.

Rohacs T, Nilius B (2007). Regulation of transient receptor potential (TRP) channels by phosphoinositides. *Pflugers Arch.* Oct; 455 (1): 157 - 168.

Rorsman P, Bokvist K, Ammälä C, Arkhammar P, Berggren PO, Larsson O, Wåhlander K (1991). Activation by adrenaline of a low-conductance G protein-dependent K<sup>+</sup> channel in mouse pancreatic B cells. *Nature* Jan 3; 349 (6304): 77 - 79.

Rorsman P, Eliasson L, Kanno T, Zhang Q, Gopel S (2011). Electrophysiology of pancreatic  $\beta$ -cells in intact mouse islets of Langerhans. *Prog Biophys Mol Biol.* Nov; 107 (2): 224 - 235.

Rorsman P, Renström E (2003). Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia* Aug; 46 (8): 1029 - 1045.

Rosengren AH, Jokubka R, Tojjar D, Granhall C, Hansson O, Li DQ, Nagaraj V, Reinbothe TM, Tuncel J, Eliasson L, Groop L, Rorsman P, Salehi A, Lyssenko V, Luthman H, Renström E (2010). Overexpression of  $\alpha$ 2A-adrenergic receptors contributes to type 2 diabetes. *Science* Jan 8; 327 (5962): 217 - 220.

Ruiz de Azua I, Gautam D, Guettier JM, Wess J (2011). Novel insights into the function of  $\beta$ -cell M3 muscarinic acetylcholine receptors: therapeutic implications. *Trends Endocrinol Metab.* Feb; 22 (2): 74 - 80.

Sadja R, Alagem N, Reuveny E (2003). Gating of GIRK channels: details of an intricate, membrane-delimited signaling complex. *Neuron* Jul 3; 39 (1): 9 - 12.

Santulli G, Lombardi A, Sorriento D, Anastasio A, Del Giudice C, Formisano P, Béguinot F, Trimarco B, Miele C, Iaccarino G (2012). Age-related impairment in insulin release: the essential role of  $\beta$ (2)-adrenergic receptor. *Diabetes* Mar; 61 (3): 692 - 701.

Schaefer M (2005). Homo- and heteromeric assembly of TRP channel subunits. *Pflugers Arch.* Oct; 451 (1): 35 – 42.

Schmitz J, Holzgrabe U (2011). Die Entwicklung selektiver  $\alpha_2$ -Rezeptor-Agonisten. *Pharm. Unserer Zeit* (40): 496 - 502.

Schulz R (2001). The pharmacology of phosducin. *Pharmacol Res.* Jan; 43 (1): 1 - 10.

Schumacher M, Akwa Y, Guennoun R, Robert F, Labombarda F, Desarnaud F, Robel P, De Nicola AF, Baulieu EE (2000). Steroid synthesis and metabolism in the nervous system: trophic and protective effects. *J Neurocytol.* May-Jun; 29 (5-6): 307 - 326.

Schwindinger WF, Giger KE, Betz KS, Stauffer AM, Sunderlin EM, Sim-Selley LJ, Selley DE, Bronson SK, Robishaw JD (2004). Mice with deficiency of G protein gamma3 are lean and have seizures. *Mol Cell Biol.* Sep; 24 (17): 7758 - 7768.

Shen Y, Rampino MA, Carroll RC, Nawy S (2012). G-protein-mediated inhibition of the Trp channel TRPM1 requires the G $\beta\gamma$  dimer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 May 29; 109 (22): 8752 – 8757.

Sherman-Gold R et al. (1993). *The Axon Guide*. Axon Instruments, Inc.

Smrcka AV (2008). G protein  $\beta\gamma$  subunits: central mediators of G protein-coupled receptor signaling. *Cell Mol Life Sci.* Jul; 65 (14): 2191 - 21214.

Soria B, Tudurí E, González A, Hmadcha A, Martin F, Nadal A, Quesada I (2010). Pancreatic islet cells: a model for calcium-dependent peptide release. *HFSP J.* Apr; 4 (2): 52 - 60.

Starke K (2011). Die Geschichte der  $\alpha$ -Adrenozeptor-Agonisten. *Pharm. Unserer Zeit*, Juni (40): 456 - 461.

Strathmann MP, Simon MI (1991). G alpha 12 and G alpha 13 subunits define a fourth class of G protein alpha subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul 1; 88 (13): 5582 - 5586.

Straub I, Mohr F, Stab J, Konrad M, Philipp SE, Oberwinkler J, Schaefer M. Citrus fruit and fabacea secondary metabolites potently and selectively block TRPM3 (2013). *Br J Pharmacol.* Apr; 168 (8): 1835 - 1850.

Straub SG, Sharp GW (2012). Evolving insights regarding mechanisms for the inhibition of insulin release by norepinephrine and heterotrimeric G proteins. *Am J Physiol Cell Physiol.* Jun 15; 302 (12): C1687 - 1698.

Strobel G (2002). Interactions between catecholamines,  $\beta$ -adrenoceptors, acute and chronic exercise. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin Jahrgang 53, Nr. 4.*



Strowski MZ, Parmar RM, Blake AD, Schaeffer JM (2000). Somatostatin inhibits insulin and glucagon secretion via two receptors subtypes: an in vitro study of pancreatic islets from somatostatin receptor 2 knockout mice. *Endocrinology*. Jan; 141 (1): 111 - 117.

Swayne LA, Mezghrani A, Varrault A, Chemin J, Bertrand G, Dalle S, Bourinet E, Lory P, Miller RJ, Nargeot J, Monteil A (2009). The NALCN ion channel is activated by M3 muscarinic receptors in a pancreatic beta-cell line. *EMBO Rep*. Aug; 10 (8): 873 - 880.

Taborsky GJ Jr (2010). The physiology of glucagon. *J Diabetes Sci Technol*. Nov 1; 4 (6): 1338 - 1344.

Takezawa R, Schmitz C, Demeuse P, Scharenberg AM, Penner R, Fleig A (2004). Receptor-mediated regulation of the TRPM7 channel through its endogenous protein kinase domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 20 ;101 (16): 6009 - 6014.

Taskén K, Aandahl EM (2004). Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev*. Jan; 84 (1): 137 - 167.

Tengholm A (2012). Cyclic AMP dynamics in the pancreatic  $\beta$ -cell. *Ups J Med Sci*. Nov; 117 (4): 355 - 369.

Thiel G, Müller I, Rössler OG (2013). Signal transduction via TRPM3 channels in pancreatic  $\beta$ -cells. *J Mol Endocrinol*. Apr 23; 50 (3): R75 - 83.

Tsiavaliaris G, Manstein DJ (2003). TIRF-Mikroskopie und ihre Anwendung in der Biologie. *BIOspektrum* Mar 9. Jahrgang.

Uchida K, Dezaki K, Damdindorj B, Inada H, Shiuchi T, Mori Y, Yada T, Minokoshi Y, Tominaga M (2011). Lack of TRPM2 impaired insulin secretion and glucose metabolisms in mice. *Diabetes*. Jan; 60(1): 119 - 126.

Uchida K, Tominaga M (2011). The role of thermosensitive TRP (transient receptor potential) channels in insulin secretion. *Endocr J*. 2011;58(12):1021-8. Epub 2011 Jul 23.

Vardi T, Fina M, Zhang L, Dhingra A, Vardi N (2011). mGluR6 transcripts in non-neuronal tissues. *J Histochem Cytochem*. Dec; 59 (12): 1076 - 1086.

Venkatachalam K, Montell C (2007). TRP Channels. *Annual Review of Biochemistry* Vol. 76: 387 - 417

Venkatakrishnan AJ, Deupi X, Lebon G, Tate CG, Schertler GF, Babu MM (2013). Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature*. Feb 14; 494 (7436): 185 - 194.

Vennekens R, Olausson J, Meissner M, Bloch W, Mathar I, Philipp SE, Schmitz F, Weissgerber P, Nilius B, Flockerzi V, Freichel M (2007). Increased IgE-dependent mast cell activation and

anaphylactic responses in mice lacking the calcium-activated nonselective cation channel TRPM4. *Nat Immunol.* Mar; 8(3): 312 - 320.

Vriens J, Nilius B, Vennekens R (2008). Herbal compounds and toxins modulating TRP channels. *Curr Neuropharmacol.* Mar; 6(1): 79 - 96.

Vriens J, Owsianik G, Hofmann T, Philipp SE, Stab J, Chen X, Benoit M, Xue F, Janssens A, Kerselaers S, Oberwinkler J, Vennekens R, Gudermann T, Nilius B, Voets T (2011). TRPM3 is a nociceptor channel involved in the detection of noxious heat. *Neuron* May 12; 70(3): 482 - 94.

Wagner TF, Drews A, Loch S, Mohr F, Philipp SE, Lambert S, Oberwinkler J (2010). TRPM3 channels provide a regulated influx pathway for zinc in pancreatic beta cells. *Pflugers Arch.* Sep; 460 (4): 755 - 765.

Wagner TF, Loch S, Lambert S, Straub I, Mannebach S, Mathar I, Düfer M, Lis A, Flockerzi V, Philipp SE, Oberwinkler J (2008). Transient receptor potential M3 channels are ionotropic steroid receptors in pancreatic beta cells. *Nat Cell Biol.* Dec; 10(12): 1421 - 1430.

Walder RY, Landau D, Meyer P, Shalev H, Tsolia M, Borochowitz Z, Boettger MB, Beck GE, Englehardt RK, Carmi R, Sheffield VC (2002). Mutation of TRPM6 causes familial hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Nat Genet.* Jun; 31(2): 171 – 174.

Wall MA, Coleman DE, Lee E, Iñiguez-Lluhi JA, Posner BA, Gilman AG, Sprang SR (1995). The structure of the G protein heterotrimer Gi alpha 1 beta 1 gamma 2. *Cell* Dec 15; 83 (6): 1047 - 1058.

Wallukat G (2002). The beta-adrenergic receptors. *Herz Nov;* 27 (7): 683 - 690.

Whorton MR, MacKinnon R (2013). X-ray structure of the mammalian GIRK2-βγ G-protein complex. *Nature* Jun 13; 498 (7453): 190 - 197.

Wilson SR, Gerhold KA, Bifulco-Fisher A, Liu Q, Patel KN, Dong X, Bautista DM (2011). TRPA1 is required for histamine-independent, Mas-related G protein-coupled receptor-mediated itch. *Nat Neurosci.* May; 14 (5): 595 – 602.

Winzell MS, Åhrén B (2007). G-protein-coupled receptors and islet function-implications for treatment of type 2 diabetes. *Pharmacol Ther.* Dec; 116 (3): 437 - 448.

Witherow DS, Wang Q, Levay K, Cabrera JL, Chen J, Willars GB, Slepak VZ (2000). Complexes of the G protein subunit gbeta 5 with the regulators of G protein signaling RGS7 and RGS9. Characterization in native tissues and in transfected cells. *J Biol Chem.* Aug 11; 275 (32): 24872 - 24880.

Wu D, Katz A, Simon MI (1993). Activation of phospholipase C beta 2 by the alpha and beta gamma subunits of trimeric GTP-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun 1; 90 (11): 5297 - 5301.

Wu-Zhang AX, Newton AC (2013). Protein kinase C pharmacology: refining the toolbox. *Biochem J*. Jun 1; 452 (2): 195 - 209.

Yovos JG (2011). The role of  $\alpha$ -,  $\delta$ - and F cells in insulin secretion and action. *Diabetes Research and Clinical Practice* Aug; Vol. 93: S25 - S26.

Yudin Y, Lukacs V, Cao C, Rohacs T (2011). Decrease in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels mediates desensitization of the cold sensor TRPM8 channels. *J Physiol*. Dec 15; 589 (Pt 24): 6007 - 6027.

Zakharian E, Cao C, Rohacs T (2010). Gating of transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) channels activated by cold and chemical agonists in planar lipid bilayers. *J Neurosci*. Sep 15; 30 (37): 12526 - 12534.

Zamponi GW, Currie KP (2013). Regulation of Ca(V)2 calcium channels by G protein coupled receptors. *Biochim Biophys Acta*. Jul; 1828 (7): 1629 - 1643.

Zhang H, Craciun LC, Mirshahi T, Rohács T, Lopes CM, Jin T, Logothetis DE (2003). PIP(2) activates KCNQ channels, and its hydrolysis underlies receptor-mediated inhibition of M currents. *Neuron* Mar 27; 37 (6): 963 - 975.

Zhang X, Mak S, Li L, Parra A, Denlinger B, Belmonte C, McNaughton PA (2012). Direct inhibition of the cold-activated TRPM8 ion channel by G $\alpha_q$ . *Nat Cell Biol*. Aug; 14 (8): 851 - 858.

Zhang Y, Hoon MA, Chandrashekar J, Mueller KL, Cook B, Wu D, Zuker CS, Ryba NJ (2003). Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell* Feb 7; 112 (3): 293 - 301.

Zhao Y, Fang Q, Straub SG, Lindau M, Sharp GW (2010). Noradrenaline inhibits exocytosis via the G protein  $\beta\gamma$  subunit and refilling of the readily releasable granule pool via the  $\alpha(i1/2)$  subunit. *J Physiol*. Sep 15; 588 (Pt 18): 3485 - 3498.

## **7. Danksagung**

An erster Stelle bin ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Johannes Oberwinkler zu großem Dank verpflichtet. Durch exzellente Betreuung und die Schaffung eines angenehmen Arbeitsklimas lieferte er hervorragende Rahmenbedingungen für diese Arbeit. Seine stetige Unterstützung, die Fülle an Ideen, sein Fachwissen und die stets kritische Hinterfragung der gemessenen Daten waren von unschätzbarem Wert für die vorliegende Arbeit. Durch die langjährige Zusammenarbeit lernte ich selbstständiges wissenschaftliches Denken und Arbeiten, kritische Analyse von Daten und eine generelle Einsicht in wissenschaftliche Abläufe.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank meinen Kollegen Oleksandr Rizun, Raissa Wehmeyer, Thomas Wagner, Anna Drews, Julia Stab, Sandra Plant, Melanie Portz, Sachar Lambert, Marc Behrendt, Kerstin Hartwig und Franziska Schneider für die schöne Zeit, die Unterstützung und die kompetente Hilfe bei vielerlei Dingen. Besonders hervorzuheben sind an dieser Stelle Raissa Wehmeyer und Sandra Plant, die aufgrund ihrer exzellenten Arbeit und ihres Einsatzes entscheidend zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Meiner Familie und meiner Freundin Yvonne (und ihrer gesamten Familie) danke ich für ein stets offenes Ohr, ihre grenzenlose Unterstützung und ihre Geduld. Ohne Euch wäre diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen.

Ich danke Prof. Dr. Veit Flockerzi, dem Graduierten Kolleg GK1326 und allen Kollegen aus Homburg, die mich stets unterstützt haben. Ein großes Dankeschön geht vor allem an Jasmin Zimmermann und Sandeep Dembla. Danke für die produktive und schöne Zeit!

Mein Dank gilt weiterhin Prof. Dr. Dominik Oliver und seiner gesamten Arbeitsgruppe. Besonderen Dank verdienen dabei Michael Leitner, für die schnelle und kompetente Hilfe bei den TIRF-Experimenten und Moritz Lindner, der eine große Hilfe bei der Durchführung der Giant-Excised Patch-Clamp Messungen war.

Ich danke Dr. Stephan Philipp, Prof. Dr. Bühnemann, Prof. Dr. Fakler, Prof. Dr. Flockerzi, Prof. Dr. Oliver und Prof. Dr. Michael Zhu für die Bereitstellung vieler Konstrukte bzw. Zelllinien.

## 8. Veröffentlichungen

Wagner TF, Drews A, Loch S, **Mohr F**, Philipp SE, Lambert S, Oberwinkler J. (2010). TRPM3 channels provide a regulated influx pathway for zinc in pancreatic beta cells. *Pflugers Arch. Sep* 460 (4): 755-765.

Straub I, **Mohr F**, Stab J, Konrad M, Philipp SE, Oberwinkler J, Schaefer M. (2012). Citrus fruit and fabacea secondary metabolites potently and selectively block TRPM3. *Br. J. Pharmacol. Apr* 168 (8): 1835-1850.

Straub I, Krugel U, **Mohr F**, Teichert J, Rizun O, Konrad M, Oberwinkler J, Schaefer M (2013). Flavanones that selectively inhibit TRPM3 attenuate thermal nociception in vivo. *Mol Pharmacol. Sep* 4 [Epub ahead of print].

Drews A\*, **Mohr F\***, Rizun O, Wagner TF, Dembla S, Rudolph S, Lambert S, Konrad M, Philipp SE, Behrendt M, Marchais-Oberwinkler S, Covey DF, Oberwinkler J. (2014): Structural requirements of steroidal agonists of transient receptor potential melastatin 3 (TRPM3) cation channels. *Br J Pharmacol. Feb* 171 (4):1019-32. (\* **these authors contributed equally to this work**).

**Mohr F**, Behrendt M, Hartwig K, Leitner M, Philipp SE, Oberwinkler J:  $\alpha_2$ -adrenergic receptor mediated inhibition of TRPM3 channels in pancreatic  $\beta$  cells. (*in preparation*).

## 9. Verzeichnis der akademischen Lehrer

### In Marburg:

Oberwinkler, Oliver

### In Saarbrücken/Homburg:

Oberwinkler, Flockerzi, Philipp, Beck, Bruns, Bernhardt, Walldorf, Walter, Schmitt, Lancaster, Müller, Hoth, Niemeyer, Wissenbach, Cavalié, Rettig, Maurer, Heinzle, Freichel, Grässer, Schwarz, Meese, Mayer, Stahl, Thiel, Zimmermann, Mues, Bauer

### In Kaiserslautern:

Büdel, Deitmer, Wirth, Krüger, Ziegler